

FORSCHUNGSBERICHT 2010/2011



HELMHOLTZ
| ZENTRUM FÜR
| INFEKTIONSFORSCHUNG



VORWORT

- 04 Das Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung – ein Portrait
- 07 Vorwort
- 08 Ein Nachruf auf Jürgen Wehland

FOKUS

- 12 Das Deutsche Zentrum für Infektionsforschung (DZIF) – Eine große Chance für das HZI
- 15 Höhepunkte 2010-2011

BERICHTE AUS DER FORSCHUNG

- 22 Grenzgänger der Hepatitis C Virus-Forschung
- 30 Die Alterung des Immunsystems – Probleme und Perspektiven
- 36 Neuartige Nanopartikel setzen Impfstoffe frei
- 42 Mykobakterielle Phagosomen und angeborene Immunität

SONDERBEITRÄGE

- 48 Was wären wir ohne DNA-Sequenzen
- 52 Magnetische Kernresonanzspektroskopie, ein wichtiges Instrument im Arsenal der Technologieplattform des HZI
- 60 Internationale Kooperationen am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung mit Indien und China: eine Erfolgsgeschichte

WISSENSCHAFTLICHER ERGEBNISBERICHT

- 64 **INFEKTION UND IMMUNITÄT**
- 67 **Mikrobielle Pathogenität**
- 69 Strukturelle Analyse von Virulenzfaktoren
- 70 Virulenzfaktoren von Streptokokken und Pneumokokken
- 71 Molekulare Mechanismen des intrazellulären Transports, des Überlebens und der Persistenz von Streptokokken
- 72 Analyse der Proteinnetzwerke früher Wirt-Pathogen-Interaktionen
- 73 Strukturelle und mechanistische Analyse funktioneller Amyloide
- 74 Dynamik von Mikrotubuli und bakterielle Pathogenese
- 75 Funktion und Regulation von *Yersinia* Virulenzfaktoren
- 76 Strukturelle Charakterisierung von Faktoren der Pathogenabwehr
- 77 Mykobakterielle Phagosomen und Immunität
- 78 Molekulare Mechanismen der Wirtszell-Pathogen-Interaktionen
- 79 Signalübertragung zur Steuerung der Aktindynamik
- 80 Erzeugung und Verwertung von DNA-Sequenzdaten

- 81 **Wirt-Pathogen-Interaktionen**
- 84 Pathogenese von chronischen *Pseudomonas aeruginosa* Infektionen
- 85 Entschlüsselung der Mechanismen der Wirtsimmunabwehr gegenüber Gram-positiven Krankheitserregern im Mausmodell
- 86 Mikrobielle Kommunikation
- 87 Die Genetik von Infektionen und Immunität
- 88 Die strukturelle Basis von Übertragungsbarrieren für Säugetierprione
- 89 Biofilm-Gemeinschaften
- 90 Metabolische Diversität

**WISSENSCHAFTLICHER
ERGEBNISBERICHT**

- 91 Entzündung und Immunität**
92 Entwicklung und funktionelle Eigenschaften von Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen
93 Mukosale Immunität und Entzündung
94 Immuneffektoren: Moleküle, Zellen und Mechanismen
95 Das Interferonsystem in antiviraler Abwehr und Immunität
96 Zelltodmechanismen im Immunsystem
97 Inflammation und Regeneration
98 Zelluläre Modelle für die Infektion
- 99 Strategien für Prävention und Therapie**
102 Molekulare Mechanismen der Hepatitis-C-Virus-Infektion und Replikation
103 Interaktion zwischen angeborener und adaptiver Immunität
104 Antigen-transportsysteme und Impfstoffe
105 Chronische Infektion und Krebs
106 Therapeutische zelluläre Vakzine
107 Molekulare Diagnostik mikrobieller Krankheitserreger
- 108 Pharmazeutische Forschung**
110 Mikrobielle Vielfalt und die Entdeckung neuer Naturstoffe
111 Medizinische Chemie von Naturstoffen
112 Chemische Biologie von Infektionskrankheiten
113 Identifizierung molekularer Angriffspunkte von Antiinfektiva
- 114 Neue Projektgruppen**
115 Regulation und herpesvirale Immunmodulation von Toll-like Rezeptoren
116 System-Immunologie
117 Die Nationale („Helmholtz“) Kohorte
118 Die Alterung des Immunsystems
119 Entwicklung neuer Diagnostika und Therapeutika zur Kontrolle und Prävention der Tuberkulose
120 Mikrobielle Proteomforschung
- 121 PoF II – UNABHÄNGIGE FORSCHUNG**
122 Funktionelle Genomik und Nischen-Spezifität
123 Strukturbiologie des Zytoskeletts
124 Strukturanalyse des angeborenen Immunsystems
- 125 TECHNOLOGISCHE PLATTFORMEN**
126 Tierexperimentelle Einheit
127 Rekombinante Proteinexpression
128 Genexpressionsanalyse
129 Peptidsynthese
130 Histologie- / Pathologie-Plattform
131 Instrumentelle Analytik
- 132 Das Helmholtz-Institut für Pharmazeutische Forschung Saarland (HIPS)
138 TWINCORE, Zentrum für Experimentelle und Klinische Infektionsforschung GmbH
148 Veröffentlichungen 2010-2011

ZAHLEN UND FAKTEN

- 172 Zahlen und Fakten

Das Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung

Unser Name ist Programm: Am Braunschweiger Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung schaffen etwa 350 Wissenschaftler und 350 Mitarbeiter aus Technik und Verwaltung die Grundlagen für neue Präventionsmethoden, Diagnoseverfahren und Medikamente, mit denen sich Infektionskrankheiten in Zukunft besser heilen oder wirksamer verhindern lassen. Die Wege, die zu diesem Ziel führen, sind ebenso vielfältig wie die der Krankheitserreger in unserem Körper: Mikrobiologen setzen sich damit auseinander, wie Bakterien und Viren es schaffen, unsere Immunbarrieren zu überwinden, wie sich Bakterien untereinander verständigen und weshalb sie uns überhaupt krank machen. Genetiker erforschen unser Erbgut und suchen nach den Gründen, weshalb ein Mensch beispielsweise an Grippe erkrankt, sein Nachbar jedoch nicht. Immunologen untersuchen, wie unser Organismus auf fremde Eindringlinge reagiert und sie abwehrt. Strukturbiologen erforschen die molekularen Strukturen von Schlüsselmolekülen bei all diesen Wechselwirkungen. Auf der Basis dieses Wissens untersuchen und entwickeln Chemiker neue Wirkstoffe, die wir den Krankheitserregern entgegensetzen können. Einen anderen Weg gegen Keime haben Impfstoffforscher im Visier: Sie wollen verhindern, dass diese uns überhaupt krank machen.

Neue Diagnoseverfahren, Impfstoffe oder Medikamente lassen sich nur dann erfolgreich entwickeln, wenn man die Mechanismen von Infektionskrankheiten richtig verstanden hat. Einer von vielen Startpunkten, von dem aus sich Forscher des Helmholtz-Zentrums für Infektionsforschung dem komplizierten Geflecht „Infektion“ nähern, ist die Zelle – sowohl die des Wirtes als auch die der Bakterien. Ein Beispiel: Opportunistische Infektionen. Zu einem Problem werden sie in Krankenhäusern. Da, wo Patienten mit geschwächtem Immunsystem behandelt werden, wandeln sich unauffällige Lebensbegleiter zu gefährlichen Angreifern. Im Extremfall nisten sie sich dauerhaft in unserem Körper ein, indem sie sich zu so genannten Biofilmen zusammenschließen und unter Umständen chronische Krankheiten verursachen. In Biofilmen sind die Bakterien von einer Schutzhülle umgeben, die sie sehr wirksam vor Angriffen des Immunsystems oder Antibiotika schützt. Aber was muss überhaupt geschehen, damit ein zunächst harmloser Keim zum Angreifer wird? Wie kommunizieren Bakterien untereinander und wie mit ihrem Wirt? Erst wenn Wissenschaftler verstanden haben, wie die Wechselwirkungen zwischen Krankheitserregern und ihren Wirtszellen aussehen und welche Mechanismen hinter diesen Wechselwirkungen stehen, können sie gezielt die Kommunikation zwischen den Bakterien untereinander stören.

Infektionen liegen immer molekulare Wechselwirkungen zwischen Mensch und Erreger sowie den Erregern untereinander zugrunde. Wichtigstes Element dieses Wechselspiels sind die an Infektionen beteiligten Proteine. Sie spielen deshalb eine zentrale Rolle für das Verständnis von Infektionskrankheiten. Mit tausenden von Proteinen organisieren und katalysieren die Mikroorganismen ihr Leben. Das Ziel der Infektionsforscher ist, all diese Proteine nicht nur zu beschreiben, sondern ihre Funktion kennen zu lernen. Insbesondere die Proteine auf der Zelloberfläche sind es, die für den Kontakt mit dem Wirt verantwortlich sind – und die Frage, die über der gesamten Forschung steht, ist immer noch: Wie schaffen es Bakterien, uns zu infizieren? Zwar ist das Arsenal der verschiedenen Pathogenitätsfaktoren, mit denen Bakterien, Viren und andere mikrobielle Krankheitserreger in die Prozesse der menschlichen Zellen eingreifen, letztlich überschaubar – zu wissen, wo sie zu finden sind, und diesen Faktoren einen Namen geben zu können, heißt jedoch noch nicht, sie zu kennen. Proteine sind sehr große Moleküle mit komplexen Strukturen, und in diesen Strukturen liegt das Geheimnis ihres Erfolges. Die Wissenschaftler am HZI sehen sich die Strukturen genau an – Atom für Atom. Sie suchen nach den Nischen und Haken, mit denen sie sich aneinander schmiegen, festhalten und auch wieder voneinander lösen.

Kennen die Strukturbiologen diese entscheidenden Teile in der Molekülstruktur, können Chemiker mit diesem Wissen weiterarbeiten. Ihr Ziel ist es, maßgeschneiderte Moleküle zu entwickeln, die genau in diese Struktur passen – und so möglicherweise eine Infektion unterbrechen. Dazu suchen die Chemiker natürliche Hemmstoffe oder stellen synthetische neue her, mit denen die Funktionen der Erreger-Proteine gezielt blockiert werden können.

Die Basis für neue Wirkstoffe, die an den Schwachstellen der bakteriellen Proteine angreifen, sind häufig Naturstoffe. Sie stammen sowohl aus traditionellen als auch erst neu entdeckten Heilpflanzen, aus Pilzen oder aus Bakterien. Eine besondere Rolle spielen am HZI die Myxobakterien. Sie leben im Erdboden und setzen sich gegen bakterielle Konkurrenten mit einer Vielzahl chemischer Substanzen zur Wehr – sehr wirksame Stoffe, wenn sie von Infektionsforschern genau analysiert und zum Medikament weiterentwickelt werden. Mikrobielle Wirkstoffe gelten deshalb als die optimalen Ausgangssubstanzen zur Bekämpfung von Infektionskrankheiten, wenn es gilt, neue Therapien in die Kliniken zu bringen.



Die Aufgabe der Chemie in der Infektionsforschung ist einfach beschrieben und schwierig gemacht: Chemiker suchen nach den wirksamen Bestandteilen, mit denen sich etwa Mykobakterien gegen andere Mikroorganismen wehren oder die eine Pflanze zu einer Heilpflanze machen. Und in diesen Molekülen suchen sie nach den entscheidenden Strukturmerkmalen und chemischen Gruppen, um sie nachzubauen und sogar in ihrer Wirkung zu verbessern. Naturstoffe zu synthetisieren oder zu modifizieren, damit daraus potente Medikamente werden, ist eine Disziplin mit der sich HZI-Forscher zwischen Grundlagenforschung und medizinischer Anwendung bewegen.

Ein wichtiger Schritt auf dem Weg vom Naturstoff zur Anwendung ist die pharmazeutische Weiterentwicklung dieser Stoffe. Neue und oft multi-resistente Erreger erfordern effizientes Vorgehen bei der Entwicklung neuer Antiinfektiva. Ein Aspekt, der von der Außenstelle des HZI an der Universität des Saarlandes abgedeckt wird: dem Helmholtz-Institut für Pharmazeutische Forschung Saarland (HIPS). Die Wissenschaftler am HIPS nutzen gentechnische und genomanalytische Verfahren, um einerseits Naturstoffproduzenten zu optimieren und andererseits Leitstrukturen und Wirkstoffkandidaten medizinalchemisch weiter zu entwickeln. Zudem suchen sie nach Methoden, die Arzneistoffe besser über biologische Barrieren an ihren Wirkort zu transportieren, und entwickeln neue, optimierte Formulierungen für Arzneien.

Ebenfalls an der Grenze zwischen Grundlagenforschung und Klinik arbeiten die Impfstoffforscher des HZI. Impfstoffe gelten als effektivste und kostengünstigste Methode, Infektionskrankheiten bei Mensch und Tier vorzubeugen. Natürlich suchen HZI-Wissenschaftler auch nach neuen Impfstoffen gegen Infektionskrankheiten – eine ihrer Spezialitäten ist jedoch, die Optimierung von Vakzinen durch verbesserte Adjuvanzien. Diese Stoffe schützen selbst nicht vor den Krankheitserregern, helfen jedoch den Impfstoffen, ihre Wirkung voll zu entfalten.

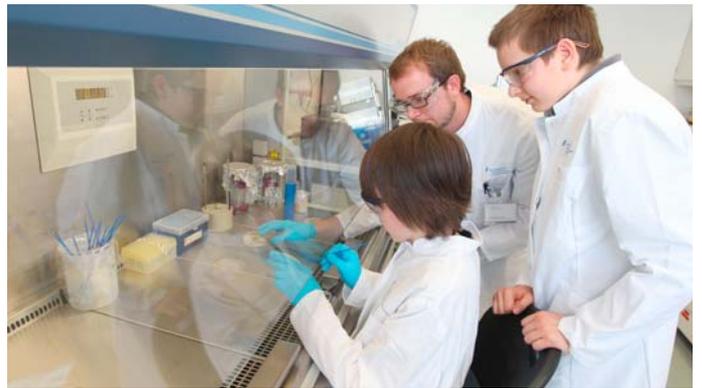
Zu einer Infektion gehören der Erreger, der befallene Organismus und Umweltfaktoren. Da die Umweltfaktoren bislang nicht überschaubar sind, konzentrieren sich die Wissenschaftler am HZI zunächst auf die Wechselwirkungen zwischen Erreger und Wirt. Der Forschungszweig, der die mit diesem Wechselspiel verbundenen sehr komplexen

Fragen beantworten möchte, entwickelt sich gerade erst: Die Systembiologie. Ob ein Wirt empfindlich oder unempfindlich auf eine Infektion reagiert, bestimmt eine ganze Reihe von Genen. Dabei beeinflussen sich die Gene auch untereinander. Ein defektes Gen kann durch andere Gene kompensiert werden, Fehler im Erbmateriale können sich gegenseitig verstärken. Die systemgenetische Untersuchung solcher Verflechtungen wird zu neuen therapeutischen Ansätzen führen. Die Instrumente dafür sind nicht ausschließlich Petrischale, Mikroskop oder Maus, sondern vor allem Computer.

Der Forschungsbogen, den das Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung von den molekularen Interaktionen zwischen Erreger und Wirt bis zu neuen Wirkstoffen und der Prävention spannt, soll direkt zum Menschen führen. In Kooperation mit der Medizinischen Hochschule Hannover ist das TWINCORE in Hannover entstanden – ein Translationszentrum, das ein Forschungstreffpunkt von Klinik und Grundlagenforschung ist. Mediziner und Grundlagenforscher arbeiten dort unter einem Dach zusammen und entwickeln gemeinsam Lösungen für die Infektionsprobleme in den Arztpraxen und Kliniken. Mit dieser und zukünftigen Kooperationen stärkt das Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung die Kompetenzen der Gesundheitsforschung im Raum Braunschweig-Hannover. Und es nähert sich schrittweise einem alten und dennoch aktuellen Problem: Dem Schutz der Menschen vor Infektionskrankheiten.

Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung
Inhoffenstraße 7
38124 Braunschweig
Tel: +49 (0)531-61 81-0
Fax: +49 (0)531-61 81-2655
info@helmholtz-hzi.de
www.helmholtz-hzi.de

 **HELMHOLTZ**
| **ZENTRUM FÜR**
INFEKTIONSFORSCHUNG



Teilnehmer der Eröffnungsveranstaltung des Symposiums "Networking and Technology Transfer", organisiert durch HZI, InWent und das Thailändische Rote Kreuz (QSMI) (Bangkok, Juni 2010). Foto: QSMI/HZI



Vorwort

Prof. Dr. Dirk Heinz | Wissenschaftlicher Geschäftsführer

Die letzten zwei Jahre waren eine Phase der Veränderung für das Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (HZI). Nach der erfolgreichen wissenschaftlichen Neuausrichtung auf das Thema Infektionsforschung verließ der Wissenschaftliche Geschäftsführer Rudi Balling das Zentrum im Jahr 2009 - zuerst für einen wissenschaftlichen Forschungsaufenthalt am Broad Institute und kurz danach dauerhaft für eine neue Position als Direktor des Luxemburg Centre for Systems Biomedicine. Mit Jürgen Wehland, dem ehemaligen Leiter der Abteilung Zellbiologie, wurde im Januar 2010 ein ausgezeichnete Nachfolger als Wissenschaftlicher Geschäftsführer berufen. Als langjähriger Kenner der am HZI betriebenen Forschung war er die ideale Wahl für die Leitung des Zentrums und die weitere strategische Ausprägung des wissenschaftlichen Profils. Nach weniger als einem Jahr im Amt bedeutete sein plötzlicher Tod am 16. August 2010 den Verlust eines in hohem Maß respektierten Kollegen und Freundes für viele von uns. Trotz dieses überschattenden Ereignisses und mit dem dritten Wissenschaftlichen Geschäftsführer in weniger als drei Jahren im Amt ist das HZI zunehmend als Zentrum ausgezeichnete Infektionsforschung sichtbar geworden. Ganz im Sinne der Veränderungen, die von Rudi Balling initiiert und durch Jürgen Wehland weitergeführt wurden, sind wichtige Projekte begonnen worden, die wir nun erfolgreich fortsetzen, sowohl auf dem HZI Campus als auch darüber hinaus:

- 2009 wurde gemeinsam mit der Universität Saarbrücken das Helmholtz- Institut für Pharmazeutische Forschung Saarbrücken (HIPS) gegründet. Das pharmazeutische Know-how am HIPS ergänzt ideal die Expertise im Bereich der Infektionskrankheiten und in der Natur- und Wirkstoffforschung am HZI.
- Zusammen mit dem Fraunhofer-Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin (ITEM), der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH), der Leibniz-Universität Hannover, der Tierärztlichen Hochschule Hannover und der Technischen Universität Braunschweig gründete das HZI 2008 die „Translationsallianz in Niedersachsen“ (TRAIN), um translationale Wirk- und Impfstoffforschung zu fördern. Im Mai 2011 begann der Bau des Clinical Research Centre Hannover (CRCH). Das CRCH ist ein Gemeinschaftsprojekt der TRAIN-Partner ITEM, MHH und HZI und wird als Plattform für frühe klinische Studien dienen.
- Das HZI nahm zusammen mit seinen Partnern in der Region Braunschweig-Hannover erfolgreich an der kompetitiven Auswahl der Gründungsmitglieder des Deutschen Zentrums für Infektionsforschung (DZIF) teil, einer Initiative des Bundesministerium für Bildung und Forschung. Zusammen mit 26 anderen Forschungseinrichtungen aus ganz Deutschland gestaltet das HZI jetzt aktiv den Gründungsprozess mit. Das DZIF wird Kräfte in der Infektionsforschung bündeln und legt den Schwerpunkt auf die Übertragung von Erkenntnissen aus der Grundlagenforschung in die medizinische Anwendung. Die zentrale DZIF-Geschäftsstelle wird am HZI angesiedelt sein.
- Gemeinsam mit diversen Partnerinstitutionen in Norddeutschland übernahm das HZI die Führung in der Entwicklung eines Konzeptes für das Zentrum für Strukturelle Systembiologie (Centre for Structural Systems Biology – CSSB). Das CSSB wird Expertise in der Strukturbiologie und Systembiologie vereinen, um die Untersuchung der bei Infektionen und anderen Krankheiten stattfindenden molekularen Prozesse auf einem bisher unerreichten Niveau räumlicher und zeitlicher Auflösung zu ermöglichen. Der Gründungsvertrag für das CSSB wurde Anfang 2011 unterzeichnet.
- Einige neue Gebäude auf dem HZI Campus sind mittlerweile bezogen worden oder stehen kurz vor der Fertigstellung:
 - Die neue Tierexperimentelle Einheit (Tierhaus II) nahm den Betrieb in 2010 auf.
 - Das Verwaltungsnebengebäude wurde Ende 2009 errichtet.
 - Das neue BSL3-Gebäude ist jetzt komplett und wird 2011 betriebsbereit sein.
 - Der Büro-Anbau für Gebäude D hatte im Frühjahr 2011 Richtfest; nach seiner Fertigstellung ist die Einrichtung neuer Laborplätze im Gebäude D geplant.

Das HZI ist nun dank dieser erfolgreichen Projekte und Kooperationen auf dem richtigen Weg in die nächste Periode der Programmorientierten Förderung (PoF III) der Helmholtz-Gemeinschaft im Jahr 2013. Das Zentrum ist strategisch gut auf die Herausforderungen in der Infektionsforschung vorbereitet. Zu den Schwerpunkten des HZI zählen dabei die Aufklärung von Infektionsprozessen, eine intensivierete Wirkstoffforschung und die stete Translation von in der Grundlagenforschung gewonnenen Erkenntnissen – stets in enger Kooperation mit unseren akademischen und industriellen Partnern. In der Zukunft werden wir weiter unser wissenschaftliches Profil stärken, indem wir herausragende Projekte fördern und zusätzliche wissenschaftliche Expertise heranziehen.

Prof. Dr. Dirk Heinz



...während eines Betriebsausflugs



...während eines Treffens mit Politikern



...während einer Doktorfeier



...während des Besuch von der Ministerin Prof. Dr. Annette Schavan



...während einer Doktorfeier



...während des TRAIN Treffens



...während des TRAIN Treffens



Jürgen Wehland †

**Wissenschaftlicher Geschäftsführer 2009-2010 | Bereichsleiter Zell- und Immunbiologie 1997-2009 |
Wissenschaftler am HZI seit 1989**

Das Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung trauert um Jürgen Wehland. Er verstarb plötzlich und unerwartet am 16. August 2010 während eines Urlaubs in Skandinavien.

Jürgen Wehland war für viele Jahre unter zahlreichen Aspekten eine Schlüsselfigur für das HZI:

Als exzellenter Wissenschaftler von internationalem Rang leistete er entscheidende Beiträge zu den Feldern der Zell- und Infektionsbiologie. Anhand des Modellorganismus *Listeria monocytogenes* konnte er zeigen, wie Pathogene das Aktinzytoskelett des Wirts nutzen, um Infektionsprozesse voranzutreiben. Zusammen mit anderen führenden Wissenschaftlern legte er den Grundstein für eine neue wissenschaftliche Disziplin, die zelluläre Mikrobiologie, die sich mit den Interaktionen zwischen Pathogenen und ihren Wirten befasst und ohne die eine moderne Infektionsbiologie schlicht undenkbar wäre.

Als herausragender Wissenschaftsmanager hat er nicht nur seine eigene Abteilung zu einer der erfolgreichsten des HZI entwickelt, er repräsentierte darüber hinaus die Mission und die Vision des gesamten Zentrums, indem er das Wissenschaftliche Programm maßgeblich gestaltete, strategische Kooperationen mit unseren Partnerinstitutionen förderte und Berufungen von zentraler Bedeutung für das HZI und seine assoziierten Institute vorantrieb. Trotz der Kürze seiner Amtszeit als Wissenschaftlicher Geschäftsführer des HZI führte er das Zentrum in Richtung spannender und zukunftssträchtiger Ziele.

Als fürsorglicher Vorgesetzter und inspirierender Mentor hat er zahlreiche wissenschaftliche Lebenswege junger Wissenschaftler am HZI und darüber hinaus aktiv gefördert und begleitet.

Als geschätzter Kollege und Freund für viele von uns stand seine Tür jedem offen, der seinen wissenschaftlichen oder persönlichen Rat suchte.

Jürgen Wehland dachte stets an sich zuletzt – neben seiner Familie folgten die Forschung, die Mitarbeiter, das Zentrum und seine Arbeit als Gutachter und in zahlreichen Gremien; dafür hat er sich selbstlos eingesetzt, unprätentiös, ein Vorbild für alle von uns.

Wir werden ihn immer vermissen!

FOKUS

BERICHTE AUS DER FORSCHUNG

SONDERBEITRÄGE



Fotos von links nach rechts: Die Vertreter der HZI-Doktorandenvereinigung geben die Preisträgerin für den besten Doktorandenbetreuer des Jahres 2010 bekannt: Priv.-Doz. Dr. Eva Medina | Thomas Gazlig, Leiter Öffentlichkeitsarbeit der HGF, während der Ausstellung "Wunderkammer der Wissenschaft" in den Braunschweiger "Schloss-Akarden" | Prof. Dr. Kurt Wüthrich, Nobelpreisträger, in einer Diskussion mit Maxi Scheiter über Ergebnisse ihres Posters Fotos: HZI, Hübner (li) | HZI (mi) | HZI, Hübner (re)



**12 Das Deutsche Zentrum für Infektionsforschung (DZIF) –
Eine große Chance für das HZI – ein Interview**

15 Höhepunkte 2010–2011



Das Deutsche Zentrum für Infektionsforschung (DZIF) – Eine große Chance für das HZI

INTERVIEW MIT | Prof. Dr. Dirk Heinz | Wissenschaftlicher Geschäftsführer des Helmholtz-Zentrums für Infektionsforschung – HZI

Herr Professor Heinz, im November 2010 ist das HZI als Partner-Einrichtung für das Deutsche Zentrum für Infektionsforschung ausgewählt worden. Worum handelt es sich dabei, und was bedeutet diese Entscheidung für das Braunschweiger Forschungszentrum?

Dirk Heinz: Wir sind sehr stolz darauf, zu der kleinen Gruppe führender Forschungseinrichtungen zu gehören, die beauftragt wurde, gemeinsam das Deutsche Zentrum für Infektionsforschung, kurz: DZIF, zu gründen. Das DZIF ist Teil einer groß angelegten Initiative des Bundesministeriums für Bildung und Forschung. Mehrere Deutsche Zentren für Gesundheitsforschung sind ins Leben gerufen worden, um gezielter gegen die großen Volkskrankheiten vorzugehen: Forschungsanstrengungen zu bündeln, den Austausch zwischen den beteiligten Institutionen zu verbessern und den Fluss der Innovation aus der Grundlagenforschung in die Klinik, die so genannte Translation, zu beschleunigen.

Welche Volkskrankheiten will die Bundesregierung damit ins Visier nehmen?

DH: Im Rahmen dieser Initiative soll ein Deutsches Konsortium für translationale Krebsforschung sowie jeweils ein Deutsches Zentrum für Herz-Kreislauf-Forschung, Lungenforschung und eben Infektionsforschung gegründet werden. Voraussetzung für die Auswahl der Standorte war, dass sie neben ihrer wissenschaftlichen Expertise in der Lage sind, Translationsforschung intensiv voranzutreiben. Dafür werden sowohl die infrastrukturellen als auch die personellen Strukturen dauerhaft finanziert.

Wie kann man sich die Arbeit eines solchen nationalen Gesundheitsforschungszentrums vorstellen?

DH: Bei den meisten Zentren, auch beim DZIF, handelt es sich um standortübergreifende Konstrukte: Es entstehen hier keine neuen großen Forschungseinrichtungen, vielmehr werden führende Institutionen zusammengeführt, um sich zu vernetzen und unter einem gemeinsamen organisatorischen Dach koordiniert zu arbeiten. So ist es auch beim DZIF mit seinen sieben Standorten Hannover-Braunschweig, Hamburg-Lübeck-Borstel, Bonn-Köln, Tübingen, München, Heidelberg und Gießen-Marburg-Langen. Die gemeinsame Geschäftsstelle, die die Arbeit an den verschiedenen Forschungsprojekten innerhalb des DZIF koordiniert, wird in Braunschweig auf dem HZI-Campus angesiedelt sein.



Die teilnehmenden Institute/Arbeitsgruppen des DZIF sind in den angegebenen Städten/Räumen beheimatet. Weitere Details im Text.

An welchen Themen, welchen Erregern soll denn im DZIF geforscht werden?

DH: Grundsätzliches Ziel ist es, wichtige Gesundheitsprobleme in Deutschland und weltweit in Angriff zu nehmen. Deshalb sind unter anderem chronische virale Erkrankungen ein großes Thema, also etwa HIV und Hepatitis. Einen weiteren Schwerpunkt bilden gastrointestinale Infektionen mit *Helicobacter* und anderen pathogenen Bakterien – Gebiete, zu denen auch unser Standort einiges beitragen wird. Auch Tuberkulose und Malaria sind weiterhin hochaktuelle Themen in der Infektionsforschung. Und natürlich die Krankenhausinfektionen mit den immer wieder auftauchenden Problemen Antibiotikaresistenz und Biofilmbildung. Hier spielen insbesondere MRSA und Pseudomonaden eine Rolle. Darüber hinaus werden sich die Forscher im DZIF mit übergeordneten Fragestellungen der Infektionsforschung beschäftigen wie der Kontrolle von Erregern durch das Immunsystem, verbesserten Impfungen und vor allem auch neuen Wirkstoffen gegen Infektionen.

Worin liegt der Vorteil eines so großen Verbundes wie des DZIF gegenüber den vielen Kooperationen, die wir ohnehin schon haben – national wie international?

DH: Es ist ein anderer Ansatz. Wir werden in Zukunft nicht mehr so forschen und kooperieren, wie wir das bisher gemacht haben, sondern neue Wege einschlagen. Die starken Partnerinstitutionen können durch die Zusammenführung im DZIF gemeinsam auf einem ganz neuen Niveau Infrastrukturen und Expertisen nutzen, um konsequenter den Weg von den Ergebnissen der Grundlagenforschung bis hin zur klinischen Studie zu gehen. Das Ziel sind neue Therapeutika oder Präventivmaßnahmen wie neuartige Impfstoffe und Impfstrategien. Wir müssen jetzt zusammenarbeiten und unsere jeweiligen Expertisen synergistisch so zur Verfügung stellen, dass die bestmöglichen Ergebnisse für öffentliche Gesundheit erzielt werden. Das eröffnet natürlich Möglichkeiten, die man vorher unter Umständen nicht gesehen hat.

Was wird denn die Aufgabe, die besondere Rolle des HZI innerhalb des DZIF-Verbundes sein?

DH: Aufgrund unserer besonderen Expertise ist die Wirkstoffforschung das zentrale Thema der HZI-Forscher im DZIF. Dabei spielen – neben den Aktivitäten auf dem HZI-Campus – das TWINCORE und das Helmholtz-Institut für Pharmazeutische Forschung Saarland (HIPS) eine wichtige Rolle.



...sondern neue Wege einschlagen. Die starken Partnerinstitutionen können durch die Zusammenführung im DZIF gemeinsam auf einem ganz neuen Niveau Infrastrukturen und Expertisen nutzen, um konsequenter den Weg von den Ergebnissen der Grundlagenforschung bis hin zur klinischen Studie zu gehen... Foto: HZI; Gramann

Gemeinsam erweitern wir ständig den Pool an Naturstoffen aus Myxobakterien, die sich als sehr potente Wirkstoffproduzenten erwiesen haben. Gegenwärtig haben 80 Prozent aller auf dem Markt befindlichen Antibiotika ihren Ursprung in Naturstoffen. Dies zeigt, dass man auf der Suche nach neuen Antiinfektiva auf den existierenden aber noch nicht hinreichend erschlossenen Naturstofffundus zurückgreifen sollte. Außerdem können neue, bislang unbekannt Verbindungen durch die gezielte genetische Modifikation von Produzentstämmen erzeugt oder bereits bekannte Verbindungen in größeren Mengen hergestellt werden. Die bestehende Naturstoffbank am HZI werden wir nun weiter ausbauen und einem großen Konsortium von Partnern für Forschungen an ganz unterschiedlichen Pathogenen zugänglich machen. Chemiker ermöglichen die Wandlung vom Screening-Hit zum Wirkstoffkandidaten, außerdem bedienen wir Themen wie Drug Delivery-Verfahren. Hier kommt unsere Pharmazie am HIPS ins Spiel. Ohne pharmazeutische Forschung gelangt man nicht zu Arzneimitteln, die man dann in klinischen Studien nutzen kann. Akademische Grundlagenforschung als Basis für die Entwicklung neuer Medikamente: Damit haben wir innerhalb des DZIF ein zukunftssträchtiges Alleinstellungsmerkmal. Das war neben unserer Erfahrung in der Translationsforschung ein Hauptkriterium für unsere Förderung.

Und organisatorisch? Sie erwähnten ja, dass die Geschäftsstelle nach Braunschweig kommen wird...

DH: Der Bund kann institutionalisiertes Geld nicht direkt den Universitäten zukommen lassen, da die Universitäten Landesinstitutionen sind. Das heißt, der Bund braucht dafür eine Institution, die mehrheitlich eine Bundeseinrichtung ist, also ein Helmholtz-Zentrum. In allen Deutschen Zentren für Gesundheitsforschung gibt es ein Helmholtz-Zentrum, über das die Gelder in die jeweiligen Konsortien fließen. Wir sind damit praktisch Projektträger und übernehmen die Mittelweitergabe und das Controlling. Dieses Fördermittelmanagement muss daher auch zwangsläufig am HZI angesiedelt sein. Die Geschäftsstelle des DZIF wird eng mit dem Fördermittelmanagement zusammenarbeiten, ein weiterer wichtiger Grund für ihre Ansiedlung hier am HZI. Die Geschäftsstelle selbst ist aber unabhängig vom HZI und unseren eigenen Projekten.

Und von welchen Fördersummen sprechen wir?

DH: In der Endausbaustufe ab 2015 sind für das gesamte DZIF fast 40 Millionen Euro pro Jahr geplant. Die Förderung beginnt in Ausbaustufen in diesem Herbst, und unser HZI-Anteil wird – im Endausbau – bei voraussichtlich mehreren Millionen Euro pro Jahr liegen.

Die Wissenschaftler, deren Arbeiten in die Bewerbung für das DZIF eingegangen sind, arbeiten ja bereits. Sie arbeiten teilweise seit Jahren mit voller Kraft an ihren wissenschaftlichen Zielen. Nun kommen die Ziele des DZIF noch dazu. Werden die Ressourcen aufgestockt? Wofür wird das Geld aus dem DZIF verwendet?

DH: Zum einen, um Infrastruktur und Expertisen aufzubauen, um überhaupt dem Anspruch, Translation wissenschaftlich zu leben, gerecht zu werden. Wir werden beispielsweise die Wirkstoffforschung auf dem HZI-Campus durch Berufungen verstärken. Das heißt, Kollegen werden gezielt über das DZIF finanziert. Ebenfalls denkbar wäre eine Berufung in Bioinformatik. Vorwiegend dort investieren wir die neuen Mittel. Aber das schließt natürlich nicht aus, dass Kollegen ihre Expertise in die großen thematischen Handlungsstränge einbeziehen. Einige Beispiele sind etwa Thomas Pietschmann mit viraler Hepatitis und Susanne Häußler im Bereich Antibiotika-resistenter Infektionen. Und darüber bringen wir übrigens auch einen beträchtlichen Anteil an Eigenmitteln in das DZIF mit ein.

Noch einmal kurz zum Thema Translation, das ja ein Hauptanliegen des DZIF ist. Das HZI hat doch hier bislang schon sehr viel bewegt. Es gibt bereits die Translationsallianz in Niedersachsen, TRAIN, es gibt das TWINCORE, Zentrum für Experimentelle und Klinische Infektionsforschung. Darin sind Partner, die auch Teil des DZIF sein werden, bereits in Translationsaktivitäten miteinander verbunden. Wie werden die Wechselwirkungen mit dem DZIF aussehen?

DH: Ohne TRAIN hätten wir vermutlich auch nicht das TWINCORE. Möglicherweise hätten die Gutachter dann die Grundlagenforschung hier in Braunschweig und die klinische Forschung in Hannover als isolierte Standortaktivitäten gesehen, die nur in Kleinprojekten kooperieren. Solchen Einrichtungen Geld zu geben, ließe nicht erwarten, dass sie in fünf Jahren in größeren Strukturen miteinander forschen. TRAIN und TWINCORE waren also die Voraussetzung dafür, dass wir gemeinsam mit der MHH einen so bedeutsamen Doppelstandort innerhalb des DZIF bilden. Ich sehe das DZIF als konsequente Erweiterung unserer Translationsaktivitäten. Wir gehen jetzt über die lokalen Aktivitäten hinaus – mit den Themen, die im DZIF vorgegeben sind – und nutzen dafür die starken lokalen Strukturen. Und TRAIN und TWINCORE bearbeiten ja auch andere Projekte als im DZIF vorgesehen sind.



...Ich sehe das DZIF als konsequente Erweiterung unserer Translationsaktivitäten. Wir gehen jetzt über die lokalen Aktivitäten hinaus... Foto: HZI; Gramann

Was bedeutet die Arbeit am DZIF ganz konkret für das HZI? Werden die Mitarbeiter hier auf dem Campus merken, dass es das DZIF gibt?

DH: Ein Teil der Mitarbeiter ja, definitiv nicht alle. In unserem Antrag zum DZIF haben wir auch nicht alle Abteilungen involviert. Wir haben den Schwerpunkt auf Wirt-Pathogen-Interaktionen und funktionelle Genomforschung, vor allem aber auf Wirkstoffforschung gelegt. Kollegen, die in diesen Bereichen forschen, werden aktiv an den entsprechenden thematischen Handlungssträngen mitarbeiten. Dort werden sie Teil einer Translationspipeline zu einer bestimmten Thematik werden.

Und wann geht es los?

DH: Voraussichtlich im Sommer, spätestens wohl aber im Herbst 2011. Nach der Begutachtung des Gesamtantrages im April* soll entschieden werden, ob alle konkret benannten Forschungsprojekte innerhalb des DZIF in vollem Umfang gefördert werden. Und wenn diese finalen Entscheidungen gefallen sind, dann können wir starten – wir freuen uns schon auf die Zusammenarbeit mit unseren Partnern.

Das Interview wurde von Mitarbeitern der Öffentlichkeitsarbeit im März 2011 durchgeführt.



Höhepunkte 2010-2011

AUTOREN | Manfred Braun | Leiter der Abteilung Öffentlichkeitsarbeit | mbn@helmholtz-hzi.de | Dr. Bastian Dornbach | Abteilung Öffentlichkeitsarbeit | bad@helmholtz-hzi.de

Helmholtz-Wanderausstellung in Braunschweig Die „Wunderkammer Wissenschaft“ war vom 8. bis 16. April 2010 in den Braunschweiger Schloss-Arkaden zu Gast. Über 335.000 Interessierte besuchten die Wanderausstellung und informierten sich über die Forschung innerhalb der Helmholtz-Gemeinschaft. Rund 500 Bilder und Multimedia-Angebote in riesigen geöffneten Koffern gewährten Einblick in kleinste Nanowelten und gigantische Großgeräte der Helmholtz-Zentren. Das Spektrum reichte von der Nahaufnahme eines Schimmelpilzes bis zu Fotos ferner Planeten und sprach ein breites Publikum vom Schüler bis zum Erwachsenen an. Die Bilder – teils bewegt, aber immer bewegend – führten zu intensiven Gesprächen mit den Ausstellungsbegleitern aus dem HZI.



Ein Blick auf die Ausstellung „Wunderkammer Wissenschaft“ in den Schloss-Arkaden Braunschweig. Foto: HZI, Ritter

Science Shopping – Wissenschaft bis in die Nacht Beim „Moonlight Shopping“ in der Braunschweiger Innenstadt präsentierte das HZI als eine von 13 regionalen Forschungseinrichtungen seine „Wissenschaft bis in die Nacht“. An vier Lernstationen konnten sich Besucher vom Nachmittag bis 23.00 Uhr über Infektionskrankheiten informieren und mit Wissenschaftlern experimentieren. Die Themen: Wie wirkt eine Impfung und wie funktioniert unser Immunsystem? Weshalb kennt eine Grippe keine Grenzen? Was sind Prionen? Informationstafeln zeigten den Einfluss der Infektionskrankheiten auf zeitgenössische Kunst. Junge Forscher konnten selbst ausprobieren, weshalb Rotkohl auch Blaukraut genannt wird. Organisiert wurde die Veranstaltung von den Forschungseinrichtungen gemeinsam mit dem Braunschweiger Stadtmarketing und Geschäften in der Braunschweiger Innenstadt.

Inhoffen Medaille 2010 an Herbert Waldmann Inhoffen-Preisträger des Jahres 2010 war Prof. Dr. Herbert Waldmann vom Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund. Herbert Waldmann erhielt den vom Förderverein des Helmholtz-Zentrums gestifteten Preis für seine Synthesen neuer Wirkstoffe. Der Biochemiker Herbert Waldmann sucht in der Natur nach Vorbildern für neue potenzielle Medikamente – kleine, biologisch aktive Moleküle, die von Pflanzen, Mikroorganismen und Tieren beispielsweise zur Verteidigung oder als Botenstoffe zwischen Zellen und Organen produziert werden. Viele Naturstoffe wirken nicht nur auf ihre ursprünglichen Ziele, sondern auch auf bestimmte menschliche Stoffwechselprozesse. Fast die Hälfte aller derzeit verfügbaren Arzneimittel basiert auf Naturstoffen oder naturstoffähnlichen Verbindungen. Herbert Waldmann und seinen Mitarbeitern ist es in jahrelanger Arbeit gelungen eine Vielfalt an neuen Substanzen zu synthetisieren. Einige spielen als Hemmstoff eine maßgebliche Rolle beim Wachstum von Brust-, Eierstock- und Magentumoren, andere regulieren den Blutzucker oder sind an der Reizleitung im Nervensystem beteiligt.



Das HZI nahm an der Veranstaltung „Moonlight Shopping“ in der Braunschweiger Innenstadt als eine von 13 regionalen Forschungseinrichtungen unter dem Motto „Wissenschaft bis in die Nacht“ teil. Foto: HZI, Morczinietz



Prof. Dr. Herbert Waldmann (Mitte) mit der Inhoffen-Medaille 2010. Links von ihm Prof. Dr. Jürgen Wehland (†, seinerzeit Wissensch. Geschäftsführer am HZI) und rechts Prof. Dr. Joachim Klein (Vorsitzender des HZI Fördervereins)

Foto: HZI, Gramann

Ferienkurs „Alles Zucker“ Biochemisches Arbeiten durch eigenes Experimentieren zu erfahren und journalistisch aufzuarbeiten, war das Ziel eines viertägigen Sommerferienkurses für Schüler, den das Schülerlabor BioS und die Öffentlichkeitsarbeit des HZI gemeinsam veranstalteten. Das Thema: Zucker in seinen unterschiedlichsten Formen. Die Schüler lernten biochemische Nachweismethoden für alltägliche Zucker kennen und gewannen einen ersten Eindruck davon, wie die Arbeit in einem Labor funktioniert. Im zweiten Teil des Kurses lernten die Schüler verschiedene journalistische Formate kennen und arbeiteten ihr Wissen über Themen wie Diabetes und Laktose-Intoleranz auf. Diese Kombination aus biochemischem Arbeiten und der Reflexion über wissenschaftlich verwandte Themen war sehr erfolgreich – nicht nur, weil es den Schülern Spaß an der Arbeit vermittelte, sondern auch, weil sie über den journalistischen Ansatz lernten, die richtigen Fragen zu stellen, um gute Antworten zu erhalten.



Eine Gruppe von Schülern, die am Ferienkurs des Schülerlabors BioS teilnahmen. Auf der rechten Seite Dr. Iris Eisenbeiser (BioS). Foto: HZI, Fischer

HZI bei NDR Info: Große Angst vor kleinen Viren – Den Krankheitserregern auf der Spur NDR Info, das Informationsradio des Norddeutschen Rundfunks, startete im

März 2010 gemeinsam mit der „Braunschweiger Zeitung“ und dem Haus der Wissenschaft“ in Braunschweig die neue Diskussions- und Sendereihe: „Logo – Wissenschaft aus Braunschweig“. Braunschweig ist laut einer EU Studie die forschungsintensivste Region in Europa mit der höchsten Wissenschaftlerdichte. Mehr als 15.000 Menschen arbeiten in 26 wissenschaftlichen Organisationen und Forschungseinrichtungen und rund 250 Firmen des Hochtechnologie-Sektors. Zur zweiten Sendung dieser Reihe im Juni diskutierte Logo-Moderatorin Regina Methler mit Expertinnen und Experten des HZI und mit dem Publikum Fragen rund um Bakterien und Viren, um unsere Ängste und die Möglichkeiten und Grenzen der Infektionsforschung. Wann kommt die nächste Pandemie? Welche Rolle spielen Bakterien in der Krebs- und Immunsystem-Forschung? Sind Tierversuche in der Infektionsforschung notwendig?

CSSB Unterzeichnung Infektionsforscher und Physiker in Norddeutschland gehen zukünftig gemeinsame Wege bei der Erforschung von Infektionskrankheiten: Auf dem Campus des Deutschen Elektronen-Synchrotrons (DESY) in Hamburg-Bahrenfeld entsteht unter der wissenschaftlichen Koordination des HZI das neue „Centre for Structural Systems Biology“ (CSSB). Das CSSB schlägt die Brücke zwischen Strukturbiologie und Systembiologie: Hier werden Biologen, Chemiker, Mediziner, Physiker und Ingenieure die Wechselwirkung von Krankheitserregern mit ihren Wirten untersuchen. Dazu stehen ihnen bei DESY deutschlandweit einmalige Werkzeuge zur Verfügung: die Speicherring-Röntgenstrahlungsquelle PETRA III, der Freie-Elektronen-Laser FLASH sowie der Röntgenlaser European XFEL, der derzeit gebaut wird. Eine Bund-Länder-Vereinbarung stellt für den Bau des CSSB 50 Millionen Euro bereit.



Nach Unterzeichnung der CSSB-Vereinbarung in Räumlichkeiten des DESY in Hamburg. Von links nach rechts: Prof. Dr. Dr. Helmut Dosch, Vorsitzender des DESY-Direktoriums; Prof. Dr. Johanna Wanka, Niedersächsische Ministerin für Wissenschaft und Kultur; Christoph Ahlhaus, Erster Bürgermeister der Freien und Hansestadt Hamburg; Prof. Dr. Annette Schavan, Bundesministerin für Bildung und Forschung (BMBF); Dr. Herling Gundelach, Senatorin der Behörde für Wissenschaft und Forschung, Hamburg; Prof. Dr. Dirk Heinz, Wissenschaftlicher Geschäftsführer des HZI. Foto: DESY, Reipka

Peter Seeberger erhält Inhoffen-Medaille 2011 Für seine vollautomatischen Kohlenhydrat-Synthesen erhielt Prof. Dr. Peter Seeberger die Inhoffen-Medaille 2011. Dem Abteilungsleiter und geschäftsführenden Direktor am Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung in Golm bei Potsdam gelang es, komplexe Kohlenhydrate vollsynthetisch herzustellen, die eine wichtige Funktion bei nahezu allen physiologischen Prozessen spielen. Kohlenhydrate, oder auch Zuckermoleküle, erfüllen vielfältige Aufgaben in und auf unseren Zellen: Sie liefern Energie, bilden die Grundlage für Oberflächenstrukturen wie Schleim, dienen Krankheitserregern aber auch oft als Anker oder Schleuse. Sie spielen daher eine entscheidende Rolle bei Infektionen und Immunreaktionen und sind attraktive Zielmoleküle für die medizinische Forschung. Bisher fehlte aber eine chemische Synthesemethode, um biologisch wichtige Zucker in größeren Mengen herzustellen – eine Lücke, die Peter Seeberger geschlossen hat.



Prof. Dr. Peter Seeberger (Mitte) mit der Inhoffen Medaille 2011. Links von ihm Prof. Dr. Joachim Klein (Vorsitzender des HZI-Fördervereins) und rechts Prof. Dr. Dirk Heinz (Wissenschaftlicher Geschäftsführer am HZI) Foto: HZI, Hübner

HZI beteiligt am Deutschen Zentrum für Infektionsforschung Neue Erkenntnisse über Krankheitserreger gewinnen und daraus neue Strategien gegen sie entwickeln: Das werden die zentralen Aufgaben des „Deutschen Zentrums für Infektionsforschung“ (DZIF) sein, das voraussichtlich im Sommer 2011 die Arbeit aufnimmt. Die Initiative des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) umfasst mehrere Partner der universitären und außeruniversitären Forschung. Das HZI ist mit der Region Hannover-Braunschweig am DZIF beteiligt. Beim HZI wird auch die Administration des DZIF liegen. Partner-Einrichtungen in der Region Hannover-Braunschweig sind – neben dem HZI – auch die Medizinische Hochschule Hannover (MHH), die Tierärztliche Hochschule Hannover (TiHo), die Technische Universität Braunschweig (TU BS), die Deutsche Sammlung



Während der Landespressekonferenz: Am Tisch stehen die Vertreter der teilnehmenden Institute der Deutschen Zentren für Gesundheitsforschung in Niedersachsen den Journalisten Rede und Antwort. Zweiter von links: Prof. Dr. Dirk Heinz (Wissenschaftlicher Geschäftsführer am HZI). Foto: MHH, Kaiser

von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) und das TWINCORE, Zentrum für Experimentelle und Klinische Infektionsforschung.

Staatssekretär Dr. Georg Schütte zu Gast am HZI

Am Montag, den 17. Januar 2010, war Dr. Georg Schütte, Staatssekretär im Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF), zu Besuch im HZI, um einen Einblick in die Forschung am HZI zu erhalten. Neben Informationen über die Welt der Viren und Mikroben hatte er in ausführlichen Gesprächen mit der Geschäftsführung Gelegenheit, sich über die Forschungsziele am HZI zu informieren. Im Anschluss besuchte er das vielfach ausgezeichnete Schülerlabor BioS und erhielt einen Einblick in die frühe Nachwuchsförderung in der biotechnologischen Forschung.



Staatssekretär Dr. Georg Schütte (BMBF) im Gespräch mit einem Schüler des Schülerlabors BioS während seines Besuchs am HZI und beim Schülerlabor. Rechts neben Dr. Schütte Prof. Dr. Dirk Heinz (Wissenschaftlicher Geschäftsführer des HZI), im Hintergrund Ulf Richter (Administrativer Geschäftsführer des HZI). Foto: HZI, Hübner

Erster „North Regio Day on Infection“ am HZI Am 1. und 2. Oktober 2010 trafen sich Wissenschaftler aus Universitäten und Forschungseinrichtungen Norddeutschlands anlässlich des ersten „North Regio Day on Infection“ am HZI: Die Forscher stellten aktuelle Forschungsergebnisse vor, lernten neue technische Entwicklungen kennen und diskutierten über wichtige Fragen und zukünftige Herausforderungen der Infektionsforschung. Den Schwerpunkt bildeten bakterielle Krankheitserreger. Koordiniert wurde das Treffen vom HZI, der Technischen Universität (TU) Braunschweig und dem Robert-Koch-Institut in Wernigerode (RKI) im Rahmen der HZI-Graduiertenschule. Ziel der „NORDI“-Symposien soll künftig sein, den Austausch zwischen den Forschern Norddeutschlands und dem wissenschaftlichen Nachwuchs zu fördern.



Die Organisatoren des Symposiums: Antje Flieder (Robert-Koch-Institut, Wernigerode), Petra Dersch (HZI) und Michael Steinert (TU Braunschweig) (von links nach rechts) Foto: HZI, Dornbach

„Day on deadly killers“ Beim „Day on Deadly Killers“ am 3. März 2011 diskutierten internationale Experten den aktuellen Stand der Infektionsforschung. Die Erreger gefürchteter Seuchen wie Cholera, Milzbrand, Tollwut und AIDS standen im Mittelpunkt eines Symposiums, bei dem Experten aus Europa, den USA und Asien ihre Forschungsergebnisse vorstellten – und neue Therapieansätze gegen Infektionskrankheiten diskutierten.

Zu den Sprechern gehörte der renommierte US-Wissenschaftler Dr. Henry F. Chambers vom General Hospital in San Francisco. Henry Chambers ist Spezialist für antibiotikaresistente Krankenhauskeime.



Prof. Les Baillie von der Welsh School of Pharmacy der Cardiff University, Großbritannien, während seines Vortrags Foto: HZI, Oumard

Genlabor und Schule Der Workshop Genlabor & Schule war vom 24.-25. September 2010 am HZI zu Gast. Die Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie (GBM) und das Braunschweiger BioS-Schülerlabor luden zum fünften Workshop des Netzwerks Genlabor & Schule ein – eine im deutschsprachigen Raum einmalige Veranstaltung: Seit 2002 treffen sich alle ein bis zwei Jahre die Menschen, die hinter knapp 40 Schülerlaboren aus Deutschland, Österreich und der Schweiz stehen. Der Workshop bot ein vielseitiges Programm aus Fachvorträgen, Posterpräsentationen und Diskussionsrunden. Der Workshop Genlabor & Schule ist ein Forum für all diejenigen, die sich mit dem naturwissenschaftlichen Nachwuchs auseinandersetzen: Wissenschaftler, Leiter und Mitarbeiter der Schülerlabore, Didaktiker aus dem Fachbereich Biologie sowie Vertreter der Kultusministerien Hessens und Niedersachsens tauschten Erfahrungen aus, um die Schülerlabore als außerschulischen Lernort weiter zu entwickeln.



Dr. Iris Eisenbeiser (links) in der Diskussion mit Teilnehmern des Workshops „Genlabor & Schule“ Foto: HZI

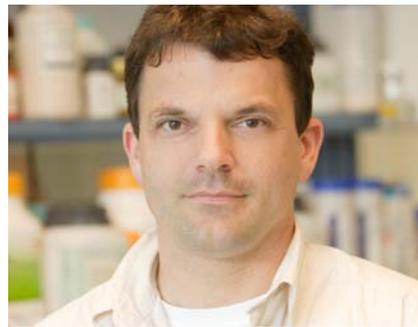
Nobelpreisträger Prof. Dr. Kurt Wüthrich zu Gast am HZI

Ein internationaler Star der Wissenschaft kam zu Besuch nach Braunschweig: am 4. April 2011 besuchte Prof. Dr. Kurt Wüthrich das HZI, um mit Forscherkollegen zu diskutieren und Erkenntnisse auszutauschen. Der gebürtige Schweizer leitet derzeit ein Labor am Scripps Institute in La Jolla, USA, sowie ein weiteres an der Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich. Sein Forschungsschwerpunkt hat direkten Bezug zur Forschung am HZI: Die Aufklärung und Untersuchung der räumlichen Struktur von biologischen Molekülen. Kurt Wüthrich entwickelte gemeinsam mit Wissenschaftler-Kollegen die Technik der so genannten „Multi-Dimensions-NMR“ zu einem leistungsfähigen Analyseverfahren für die Biochemie. Für seine Pionierarbeit wurde Kurt Wüthrich im Jahr 2002 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet.



Besuch des Nobelpreis-Trägers Prof. Dr. Kurt Wüthrich am HZI. Von links nach rechts: Prof. Dr. Christiane Ritter, Dr. Torsten Lühns (beide HZI), Prof. Dr. Kurt Wüthrich (Scripps Institute La Jolla, USA / ETH Zürich), Prof. Dr. Dirk Heinz (Wissenschaftlicher Geschäftsführer HZI). Foto: HZI, Hübner

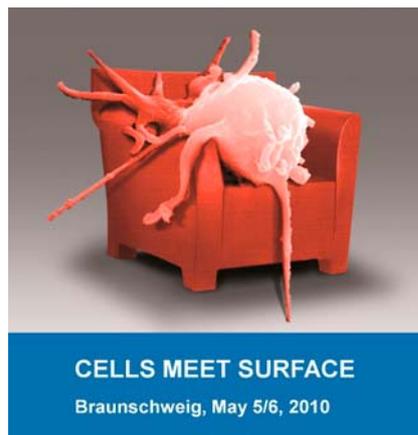
Rolf Müller mit dem DECHEMA-Preis der Max-Buchner-Forschungstiftung ausgezeichnet Für seine Forschung an biologisch aktiven Naturstoffen, die von bodenlebenden Bakterien produziert und zur Entwicklung neuer Arzneimittel genutzt werden, erhielt Prof. Dr. Rolf Müller am 26. November 2010 den mit 20.000 Euro dotierten DECHEMA-Preis der Max-Buchner-Forschungstiftung. Rolf Müller forscht an der Saarbrücker Außenstelle des HZI, dem HIPS, und lehrt an der Universität des Saarlandes. Die von Rolf Müller geleitete Abteilung konzentriert sich auf die Analyse und die Produktion von Molekülen aus Myxobakterien und Aktinomyceten mit biologischer Aktivität. Ein Beispiel für einen mikrobiellen Wirkstoff aus Myxobakterien ist Epothilon, das in den USA erfolgreich in der Krebstherapie eingesetzt wird.



Prof. Dr. Rolf Müller, HZI Foto: HZI, Gramann

Cells meet Surface Im Mai 2010 schauten Wissenschaftler etwas genauer auf die Oberfläche von und für Zellen: Am HZI veranstalteten der Berufsverband Deutscher Transfusionsmediziner, das Fraunhofer Institut für Schicht- und Oberflächentechnik, der SFB 578, das InnoNet-Projekt „InnoSurf“, das HZI und die DECHEMA das zweitägige Symposium „Cells meet Surface“.

Lange wurde der Interaktion von Zellen mit künstlichen Oberflächen wenig Beachtung geschenkt. Dabei ist diese Wechselwirkung entscheidend für das Wohlbefinden und die Kultivierung von Zellen und kann sich positiv oder negativ auf die Zelle auswirken. Das Ziel des Symposiums war es, Klinikern und klinisch-orientierten Wissenschaftlern die neuesten Entwicklungen in der Oberflächenforschung vorzustellen. Schwerpunkte bildeten dabei die Modifikation von Oberflächen und die technischen Möglichkeiten, diese zu verändern, um Zellen zu beeinflussen. Auch neue Wege der Analyse, beispielsweise basierend auf magnetischen Signalen, oder erste Schritte, die Ergebnisse in die klinische Praxis zu überführen, wurden vorgestellt.



FOKUS

BERICHTE AUS DER FORSCHUNG

SONDERBEITRÄGE



Fotos von links nach rechts: Niña S. Cortina, HIPS, während der Arbeit am "Genetix clone picking robot" | Dr. Maximiliano Gutierrez beobachtet konfokale Bilder von eukaryotischen Zellen, die von Mykobakterien infiziert wurden | Wiebke Ginter, TWINCORE, während der Vorbereitung für einen neuen Versuch Fotos: HIPS/HZI (li) | HZI, Bierstedt (mi) | Twincore/HZI (re)



- 22 Grenzgänger der Hepatitis C Virus-Forschung**

- 30 Die Alterung des Immunsystems: Probleme und Perspektiven**

- 36 Neuartige Nanopartikel setzen Impfstoffe frei**

- 42 Mykobakterielle Phagosomen und angeborene Immunität**



Grenzgänger der Hepatitis C Virus-Forschung

KORRESPONDIERENDER AUTOR | Prof. Dr. Thomas Pietschmann | **Abteilung für Experimentelle Virologie** | TWINCORE | thomas.pietschmann@twincore.de | tpi07@helmholtz-hzi.de

CO-AUTOREN | Dr. Sandra Ciesek | Dr. Eike Steinmann | beide Abteilung für Experimentelle Virologie | TWINCORE

Die Übertragung der Hepatitis C erfolgt durch direkten Blut-Blut-Kontakt: Vor 1990 waren vorwiegend Bluttransfusionen ein Problem, inzwischen spielt die Transmission durch Blutprodukte zumindest in Deutschland aufgrund hochsensibler Tests keine Rolle mehr. Risikofaktoren sind heutzutage der unsterile Umgang mit Injektionsutensilien in nichtindustrialisierten Ländern sowie i.v. Drogenkonsum in industrialisierten Ländern. Auch bei Tätowierungen, Piercings, Akupunktur und bei medizinischen Eingriffen kann die Verwendung von unzureichend sterilisiertem Besteck zur Virusübertragung führen. Eher selten sind HCV-Infektionen auf Sexualverkehr mit Hepatitis-C-positiven Geschlechtspartnern zurückzuführen. Die Übertragung der Infektion von einer HCV-positiven Mutter auf ihr Kind vor oder während der Geburt kommt in bis zu vier Prozent der Fälle vor. Bei etwa einem Drittel der HCV-Patienten ist jedoch nicht mehr nachvollziehbar, wie das Virus übertragen wurde.

Die Hepatitis-C-Virus (HCV) Infektion ist mit weltweit etwa 130 Millionen Virusträgern eine der meist verbreiteten Infektionskrankheiten. Nach Angaben des Robert-Koch-Institutes leben in Deutschland etwa eine halbe Million Virusträger. In den USA und Europa sind schätzungsweise einhalb Prozent der Bevölkerung infiziert, in Ägypten und Zentralafrika ist die Rate mit bis zu 20 Prozent deutlich höher. Das Virus ist hochvariabel und kann deswegen dem Immunsystem immer wieder ausweichen. Anhand von Sequenzanalysen werden die Viren in sieben Genotypen eingeteilt, die mehr als 30% voneinander abweichen und unterschiedlich gut auf Medikamente ansprechen.

Eine Hepatitis-C-Virusinfektion durchläuft zwei Phasen: eine akute und eine chronische. In den ersten sechs Monaten nach der Infektion durchläuft der Patient die akute, meist symptomfreie Phase. Ein Teil der Patienten kontrolliert die Virusvermehrung in dieser akuten Phase und die Infektion heilt spontan aus. Bei der Mehrheit der Patienten (50 bis 90 Prozent) wird das Virus allerdings nicht eliminiert, und es kommt zur chronischen Infektion. Bisweilen treten unspezifische Beschwerden wie Müdigkeit, Depressionen, Übelkeit, Oberbauchschmerzen und Verdauungsprobleme auf – oft wird die Infektion erst jetzt (viele Jahre nach der Ansteckung) bemerkt und nachgewiesen. Von den chronisch infizierten Patienten entwickeln wiederum bis zu 40 Prozent eine progrediente Lebererkrankung mit Ausbildung einer Leberzirrhose (Abbildung 1). Die HCV-Zirrhose ist außerdem einer der Hauptrisikofaktoren für die Entstehung eines hepatozellulären Karzinoms (HCC). Die Folgen einer chronischen Hepatitis-C-Virusinfektion zählen zu den häufigsten Indikationen für eine Lebertransplantation³. Angesichts der weltweiten Verbreitung der HCV-Infektion, ihrer großen Häufigkeit und Morbidität, kommt diesem Erreger eine wichtige klinische Bedeutung zu.

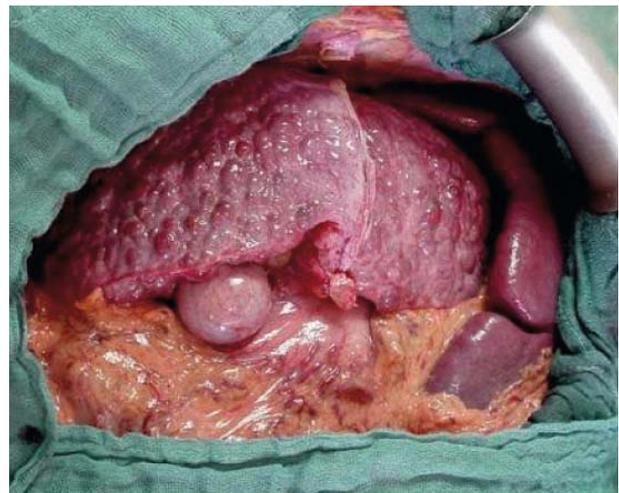


Abb. 1. Vergleich einer zirrhotischen (oben) mit einer gesunden Leber (unten). Foto: Twincore

Gegenwärtig stehen nur unzureichende Optionen für die Behandlung der Hepatitis C zur Verfügung. Seit Anfang der 90er Jahre wird die chronische HCV-Infektion mit Interferon alpha behandelt, einem Botenstoff des angeborenen Immunsystems, der in der Körperzelle Mechanismen zur Kontrolle einer Virusinfektion auslöst. Inzwischen wurde diese Therapie wesentlich optimiert. Der Einsatz von Interferon alpha (IFN-alpha) Derivaten mit längerer Halbwertszeit (pegyliertes Interferon) sowie die Kombination mit Ribavirin, einem Nukleosidanalogen, haben die Ansprechraten erheblich verbessert. Mit dieser Kombination lässt sich ein dauerhaftes virologisches Ansprechen bei 50% der Patienten mit dem HCV-Genotyp 1 erreichen, während bei Patienten mit Genotyp 2 und 3 Viren sogar in über 80% der Fälle ein dauerhafter Therapieerfolg erzielt wird¹². Neue, direkt antiviral wirkende Medikamente werden gegen Ende 2011 die Therapieoptionen verbessern. Allerdings sind diese Wirkstoffe leider nicht für die Behandlung aller viralen Genotypen geeignet. Da das Virus beim Einsatz dieser Verbindungen ohne weitere Medikamente (Monotherapie) sehr schnell resistent wird, ergänzen diese Präparate die Standardtherapie, können die nebenwirkungsreiche IFN-Ribavirin-Behandlung allerdings nicht ersetzen. So besteht weiter Bedarf für die Entwicklung neuer Therapieformen mit möglichst geringen Nebenwirkungen, genotypübergreifender Wirksamkeit und einer hohen Barriere gegen virale Resistenz.

In diesem Spannungsfeld zwischen grundsätzlichen Fragen, die das Virus aufwirft, und den klinischen Therapieanforderungen arbeiten wir am TWINCORE am HCV. Unser Team besteht aus Naturwissenschaftlern und Medizinern. Wir arbeiten eng mit der Abteilung für Chemische Biologie des HZI (Dr. Ronald Frank und Dr. Florenz Sasse) und mit der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie (Prof. Dr. Michael Manns) der MHH zusammen. Durch diese Zusammenarbeit mit HCV-Experten in der Klinik und Naturwissenschaftlern am HZI gelingt die Umsetzung eines translationalen Forschungsprogramms. Hierbei hilft die räumliche Nähe zur Medizinischen Hochschule Hannover, die eine pragmatische Umsetzung des Translationsgedankens erleichtert – etwa wenn junge Assistenzärzte gleichzeitig Forschungsprojekte aus ihrem medizinischen Umfeld am TWINCORE betreuen.

Basis für die gemeinsame Arbeit ist ein von uns entwickeltes Zellkultursystem für HCV. Auf dieser Grundlage können wir die Mechanismen der Virusreplikation in humanen Leberzellen in der Petrischale untersuchen, neue Therapieziele identifizieren und Wirkstoffe suchen, welche die Vermehrung der Viren stören. Wir nutzen dieses Modell aber auch, um HCV Übertragungsrisiken beispielsweise im Klinikumfeld oder im Drogenmilieu besser einzuschätzen zu können und um Desinfektionsmittel und Hygienemaßnahmen zu definieren, die das Virus sicher inaktivieren.

Die Entwicklung von HCV-Zellkulturmodellen Im Gegensatz zu Bakterien oder Pilzen sind Viren obligat intrazelluläre Parasiten. Sie haben keinen eigenen Stoffwechsel und sind deswegen auf geeignete Wirtszellen angewiesen. Die HCV-Replikation kann also nur in Zellkulturen untersucht werden – allerdings gelang es über Jahre hinweg nicht, ein Zellkultursystem für die Vermehrung von HCV zu entwickeln.

Erst zehn Jahre nach der Entdeckung von HCV konnten Lohmann und Bartenschlager einen wesentlichen Erfolg auf dem Weg zur Etablierung eines für die HCV-Vermehrung geeigneten Zellkulturmodells erzielen¹¹. Sie konstruierten HCV-„Minigenome“, so genannte subgenomische HCV-Replikons. Diese Replikons verfügen über alle viralen Proteine, die für die Vermehrung des Virusgenoms erforderlich sind. Allerdings tragen sie anstelle der Strukturproteine, welche für die Bildung neuer Viruspartikel benötigt werden, ein Resistenzgen. Man braucht dieses Resistenzgen, um Zellen, die Replikons aufnehmen, zu separieren: Nach dem Einschleusen der Replikons in die humane Hepatoma-Zelllinie Huh-7 wird diese Zelllinie mit einem Zellgift behandelt, das durch das Resistenzgen unschädlich gemacht wird. Es überleben nur die Zellen, welche die Replikons aufgenommen haben und diese effektiv vermehren (Abbildung 2). Ein System mit zwei wesentlichen Einschränkungen: Die Bildung und Freisetzung von Viren sowie der Infektionsprozess selber konnten nach wie vor nicht untersucht werden, da den subgenomischen Replikons die Strukturproteine fehlten.

Die Entdeckung, dass Retroviren, denen auf gentechnischem Wege die eigenen Hüllproteine entfernt wurden, die HCV-Hüllproteine E1 und E2 in funktioneller Art und Weise in ihre Virushülle aufnehmen, markierte einen weiteren wichtigen Meilenstein auf dem Weg zur Etablierung eines Zellkultursystems für HCV: So konnten Bartosch und Kollegen im Jahr 2003 zeigen, dass diese Mischviren

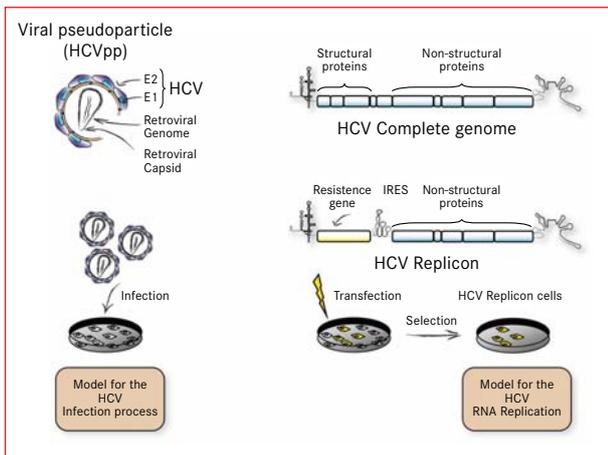


Abb. 2. Wichtige HCV Zellkulturmodellsysteme vor der Entwicklung des JFH1 Infektionssystems. IRES, Interne Ribosomen Eintrittsstelle. Grafik: Twincore

(„HCV-Pseudopartikel“; HCVpp) mit retroviralem Kern und einer HCV-typischen Virushülle präferenziell Leberzellen infizieren¹. Da die frühen Schritte der Infektion im Wesentlichen durch die Proteine in der Virushülle (im Fall der HCVpp die HCV E1- und E2-Proteine) vermittelt werden, stand erstmals ein System zur Verfügung, um den HCV-Infektionsprozess mit molekularbiologischer Technologie zu analysieren (Abbildung 2).

Die Entwicklungen der Jahre 2005 und 2006 schließlich waren es, die das HCV endlich den Methoden und Ansätzen der klassischen Virologie zugänglich machten. Gemeinsam mit Wakita und anderen Kollegen konnten wir zeigen, dass ein neues HCV-Isolat aus einem japanischen Patienten mit einer fulminanten Hepatitis („Japanese Fulminant Hepatitis 1“; JFH1) in Huh-7 Zellen nicht nur effizient replizierte, sondern auch Viruspartikel in das Kulturmedium abgab¹⁵. Außerdem gelang uns der wichtige Beweis, dass diese Partikel („Cell culture grown HCV“; HCVcc) nicht nur in Zellkultur, sondern auch *in vivo* infektiös sind. Durch die Konstruktion von JFH1-Varianten mit Strukturproteinen anderer Virusisolate konnten wir die Effizienz des Infektionssystems noch wesentlich steigern¹³. Inzwischen sind von uns und auch anderen Arbeitsgruppen weitere HCV-Chimäre konstruiert worden. Auf diese Weise sind nun auch vergleichende Untersuchungen zwischen unterschiedlichen Isolaten hinsichtlich der Mechanismen der Virusbildung und -freisetzung sowie des Infektionsweges möglich.

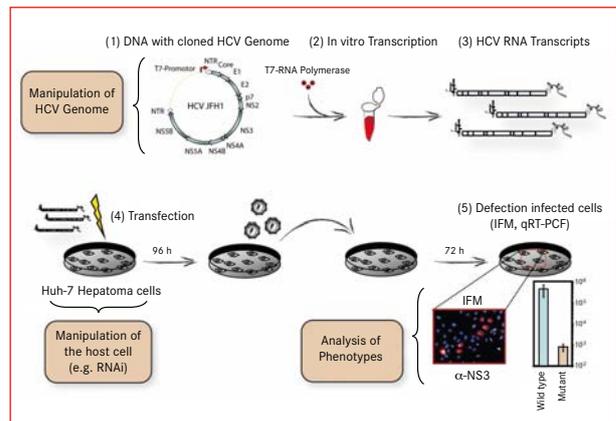


Abb. 3. Experimentelles Vorgehen zur Untersuchung der HCV Replikation mit Hilfe des JFH1 Infektionssystems. IFM, Immunfluoreszenz; qRT-PCR, quantitative Reverse-Transkriptase Polymerase Kettenreaktion; RNAi, RNA-Interferenz. Grafik: Twincore

Mit Hilfe der Molekularbiologie können wir nun gezielt das Virusgenom oder die Wirtszelle manipulieren und anschließend den Einfluss dieser Veränderungen auf die Virusvermehrung charakterisieren (Abbildung 3). So gewinnen wir wichtige Erkenntnisse über essenzielle Interaktionen des Virus mit der Wirtszelle, seinen Fortpflanzungsweg in der Zelle, und wir können neue Ziele für die Entwicklung einer direkt antiviralen Therapie identifizieren. Darüber hinaus können neue Therapieverfahren hinsichtlich ihrer Wirksamkeit geprüft werden. Damit ist unser HCV-Zellkulturmodell der zentrale Zugang, um klinisch relevante Fragen zu lösen, die in der HCV-Forschung derzeit aktuell sind.

Der Weg des Virus durch die Klinik Ein wichtiger Aspekt im Spannungsfeld HCV ist die Prävention, denn der Übertragungsweg von Blut zu Blut sollte mit geeigneten Hygienemaßnahmen beherrschbar sein. Besonders Übertragungen im Krankenhausumfeld und die Stabilität und Sensitivität von HCV gegenüber chemischen Desinfektionsmitteln stehen im Fokus unserer Arbeit. Bisherige Untersuchungen und Erfahrungen beruhen aufgrund fehlender HCV-*in-vitro*-Modelle fast ausschließlich auf Studien mit dem bovinen Diarrhö-Virus (BVDV), das ein Verwandter des HCV ist und bereits seit geraumer Zeit kultiviert werden kann. Allerdings erlauben diese Studien mit dem Surrogatvirus für HCV nur bedingt zuverlässige Einschätzung über die Infektiosität des HCV.

Mit Hilfe unseres HCV-Infektionsmodells konnten wir zeigen, dass HCV bei Raumtemperatur nach 28 Tagen und bei 4°C sogar nach 150 Tagen noch infektiös ist⁵. Da HCV *in vivo* mit humanem Serum assoziiert ist, wurde der Einfluss von menschlichem Serum gesunder Patienten auf die Stabilität von HCV analysiert. Allerdings hatte die Anwesenheit von Serum keinen Einfluss auf die HCV Überlebensdauer. Auch die Inkubation von HCV auf verschiedenen Oberflächen wie Plastik, Stahl und Handschuhen zeigte eine vergleichbare Überlebensdauer des Virus.

Limitierender Faktor dieser Studie ist, dass bisher unbekannt ist, ob Zellkulturviren und natürlich vorkommende Viren wirklich genau die gleichen Eigenschaften besitzen. Allerdings stellen Zellkulturviren nach heutigem Stand der Forschung das beste Modell dar, weil *in vivo* Studien mit Schimpansen aus ethischen Gründen aber auch aus Kostengründen sehr umstritten sind.

Überraschenderweise konnte in dieser Studie auch nachgewiesen werden, dass die Detektion von HCV-RNA nicht mit der viralen Infektiosität von HCV korreliert. Verschiedene veröffentlichte Studien basieren jedoch auf dem Nachweis von HCV-RNA durch eine PCR. Das Wissen über die fehlende Korrelation zwischen der Detektion von HCV-RNA und der Infektiosität muss bei der Interpretation solcher Studien deshalb beachtet werden. Des Weiteren wurden zur Untersuchung der HCV-Inaktivierung unterschiedliche Alkohole und sieben kommerzielle Desinfektionsmittel auf ihre viruziden Eigenschaften getestet. Dabei konnten wir zeigen, dass bestimmte Desinfektionsmittel nur in unverdünnter Anwendung zu einer vollständigen Virus-Inaktivierung führten¹⁴. Zusammenfassend sind diese Daten für den klinischen Alltag und den sicheren Umgang mit HCV positivem Material von großer Relevanz.

Derzeit arbeiten wir an weiteren Studien, die sich mit der Stabilität von HCV in Körperflüssigkeiten wie Muttermilch oder Sperma beschäftigen, da auch diese potenziell viruzide Substanzen oder Viren enthalten könnten. Außerdem ist geplant, durch spezielle Carrierversuche das Verhalten und die Stabilität von HCV nach Antrocknung auf verschiedenen Oberflächen zu untersuchen. Dieses Wissen wird uns helfen, Übertragungsrisiken besser einschätzen und damit neue HCV Infektionen vermeiden zu können.

Der Einfluss von Immunsuppressiva auf HCV Kommt es zu einer Ansteckung mit HCV, durchläuft der Infektionsprozess in vielen Fällen die oben geschilderten Stadien, an deren Ende das Hepatitis C-assoziierte chronische Leberversagen stehen kann. Es zählt weltweit zu den häufigsten Gründen für eine Lebertransplantation³. Da in der Praxis weder neutralisierende Antikörper noch potente Medikamente zur Verfügung stehen, die den Wiedereintritt des Virus in die Leber vermeiden, lässt sich eine Reinfektion der transplantierten Leber derzeit nicht verhindern. Bei mehr als 95% der Patienten kommt es nach dem Eingriff zu einer Reinfektion des Transplantats mit dem Risiko der Entwicklung einer erneuten Leberzirrhose. Die Zeit zwischen Transplantation und der Entwicklung einer Leberzirrhose ist dabei in den letzten zehn Jahren immer kürzer geworden². So dauerte es bei Patienten, die im Jahre 1988/89 transplantiert wurden, im Mittel ungefähr 5 Jahre, bis sich der Zustand der Leber um eine Fibrosestufe verschlechtert hatte. Bei Patienten, die 1996 transplantiert wurden, betrug diese Zeitspanne nur noch ein Jahr. Mehrere mögliche Faktoren, die hierbei eine Rolle spielen, wurden zwischenzeitlich identifiziert^{2,8,9}. Hinzu kommt, dass Patienten mit einer chronischen Hepatitis-C-Virusinfektion nach Lebertransplantation einen schlechteren Verlauf zeigen als Patienten mit anderen Lebererkrankungen. Sie haben im Vergleich zu Patienten mit einer Alkohol- oder Hepatitis B-assoziierten Leberzirrhose, einer primär sklerosierenden Cholangitis (PSC; eine Lebererkrankung, bei der die Gallengänge zerstört werden) oder einer Autoimmunhepatitis eine schlechtere Prognose. Hierbei spielt die Art der nach der Transplantation eingesetzten Immunsuppressiva eine Rolle. Eine HCV-spezifisch optimierte Immunsuppression könnte zu einer Verbesserung des Krankheitsverlaufes bei diesen Patienten beitragen. Ein Ziel unserer Arbeit war, alle derzeit routinemäßig eingesetzten Immunsuppressiva systematisch auf ihren Einfluss auf den gesamten Lebenszyklus von HCV zu untersuchen. Also haben wir den Viruseintritt, die RNA-Replikation und die Freisetzung mit unserem neuen HCV *in-vitro*-System untersucht⁶.

In Bezug auf die Replikation wirken sowohl Cyclosporin A als auch Mycophenolsäure und FTY720 hemmend im Infektionsmodell^{6,7}. Andere häufig verwendete Immunsuppressiva wie Tacrolimus, Everolimus, Basiliximab und Prednisolon hatten keinen wesentlichen Einfluss auf die HCV RNA-Replikation. Bei den Untersuchungen zum gesamten Lebenszyklus entdeckten wir wichtige Zusammenhänge: Es zeigte sich, dass die Inkubation mit höheren

Dosen von Prednisolon und anderen Steroiden während der Infektion zu einer vermehrten Infektiosität von HCV führte. Durch Zeitkinetikexperimente konnten wir nachweisen, dass HCV unter Steroidbehandlung schneller in die Leberzelle eindringen kann. Mithilfe retroviraler Pseudotypen konnte außerdem nachgewiesen werden, dass die Steigerung der Infektiosität spezifisch für HCV, jedoch unabhängig vom Genotyp war. Zur weiteren Charakterisierung wurde dann der Einfluss von Prednisolon auf die für HCV bekannten Rezeptoren untersucht. Hier zeigte sich eine Steigerung der mRNA und der Proteinexpression von SR-BI und Occludin, zwei Proteinen, die essenzielle Komponenten des HCV-Rezeptorkomplexes sind.

Dieser Steroideffekt konnte durch den Glucocorticoidrezeptor-Inhibitor RU-486 aufgehoben werden. Dies belegt, dass diese Signalkaskade für den Einfluss auf die Rezeptorexpression und den HCV-Zelleintritt verantwortlich ist. Schließlich konnten wir in weiteren Untersuchungen zeigen, dass die Förderung der HCV-Infektion nicht nur auf die Hepatoma-Zelllinie Huh7.5 begrenzt ist: so führte die Inkubation von Prednisolon auch zu einer gesteigerten Infektion von DMSO-differenzierten Leberzellen und primären humanen Hepatozyten. Dieses Ergebnis korreliert somit mit der klinischen Erfahrung im Patienten: denn in verschiedenen klinischen Studien wurde nachgewiesen, dass die Gabe von hohen Dosen von Steroiden, beispielsweise im Rahmen einer Abstoßungsbehandlung, mit einem Anstieg der HCV-Viruslast und einer Zunahme der Hepatitis assoziiert ist⁸. Dementsprechend könnte die Vermeidung von hoch dosierten Steroiden dazu beitragen, den klinischen Verlauf nach der HCV-induzierten Lebertransplantation zu verbessern.

Hepatitis C – nicht nur in der Leber? Bislang hat sich die Forschung an HCV vorwiegend auf die Leber konzentriert – eine naheliegende Fokussierung, da sich die Symptome vorwiegend auf die Schädigung dieses Organs zurückführen lassen. Bei genauerer Betrachtung löst eine Infektion mit HCV jedoch auch noch eine Reihe andere Symptome aus, die nicht unbedingt in einem direkten Zusammenhang mit der Leberentzündung stehen. Patienten mit einer chronischen HCV-Infektion zeigen vielfach zusätzlich unterschiedliche Störungen des Nervensystems. Häufig treten das Chronische Müdigkeits-Syndrom, Depressionen und kognitive Störungen auf. Allerdings ist unklar, ob diese Symptome auf eine direkte HCV-Replikation im Gehirn und den peripheren neuronalen Zellen zurück zu führen ist, oder auf indirekte Effekte am zentralen und peripheren

Nervensystem. Deswegen haben wir untersucht, ob Wirtszellen aus diesen Geweben – darunter menschliche Neuroblastoma- und Glioblastoma-Zelllinien und Mikroglia Zellen – HCV-Partikel aufnehmen und das Virus vermehren können⁴. In diesem Zusammenhang sind wir auf die humane periphere Neuroblastoma-Zelllinie SKNMC gestoßen, die sämtliche HCV-Eintrittsfaktoren präsentiert und effizient von unseren HCV Pseudopartikeln (HCVpp) infiziert wurde. Allerdings haben unsere Untersuchungen ebenfalls gezeigt, dass sich das Virus in diesen Zellen nicht vermehren kann. Dennoch deuten unsere Ergebnisse darauf hin, dass HCV durchaus in verschiedene nichthepatische Zelltypen eindringen und mit diesen Reservoirs den Krankheitsverlauf beeinflussen kann.

Kleine Moleküle gegen ein ungelöstes Problem Die Therapieoptionen gegen HCV sind derzeit noch unbefriedigend. Zwar befinden sich eine Reihe direkter antiviraler Substanzen in der klinischen Entwicklung, aber unerwünschte Arzneimittelwirkungen, Resistenzbildung und genotypspezifische antivirale Aktivität führen nach wie vor zu Einschränkungen. Aus diesem Grund wird weiter nach neuen Therapiewegen gesucht. Im Fokus stehen Kombinationen gut verträglicher Wirkstoffe, die an unterschiedlichen Stellen des HCV-Replikationszyklus ansetzen. So soll eine rasche Resistenzbildung vermieden werden.

Um niedermolekulare Substanzen zu identifizieren, die unterschiedliche Schritte des HCV-Replikationszyklus stören, haben wir einen neuen Dual-Reporter-Gen-Assay entwickelt und gemeinsam mit Wissenschaftlern am HZI für Hochdurchsatz-Screening-Verfahren angepasst (Abbildung 4). Es bildet den gesamten HCV-Lebenszyklus ab und ermöglicht deswegen prinzipiell die Identifizierung von Hemmstoffen gegen jeden einzelnen Schritt der viralen Vermehrung¹⁰. Das System basiert auf einem HCV-Reporter-virus, das das Gen für ein Luziferase-Enzym des Leuchtkäfers trägt (F-Luc; *firefly luciferase*). Die Wirtszellen, die für die Vermehrung von HCV verwendet werden, haben wir ebenfalls mit einem Luziferase-Gen – das des Tiefseekrebses *Gaussia* (G-Luc; *gaussia luciferase*) – ausgestattet. Da die beiden Luziferasen unterschiedliche Substrate nutzen und sich nicht gegenseitig beeinflussen, werden in einem Arbeitsgang gleichzeitig die Vermehrung des HCV und die Vitalität der Zellen bestimmt. Auf diese Weise können wir antiviral wirkende Verbindungen von Hemmstoffen des Zellwachstums und zytotoxischen Molekülen unterscheiden – also die Spreu vom Weizen trennen. Zunächst haben wir das System anhand bekannter HCV-Inhibitoren für den Zelleintritt, die Replikation und den Austritt validiert.

Anschließend haben wir aus der Substanzbibliothek des HZI niedermolekulare Verbindungen aus Myxobakterien getestet. Aus diesem Screening sind eine Reihe von Verbindungen hervorgegangen, die entweder den Zelleintritt des Virus in die Leberzellen verhindern oder deren Vermehrung beziehungsweise Wiederaustritt aus der Zelle. Aus diesen Molekülen hoffen wir, gemeinsam mit unseren Partnern am HZI und den Myxobakteriologen um Rolf Müller am HIPS, Leitstrukturen für neue HCV-Inhibitoren entwickeln zu können. Parallel wollen wir diese Substanzen nutzen, um besser zu verstehen, wie sich HCV in Leberzellen vermehrt (Abbildung 5). In dieser Hinsicht bieten uns die myxobakteriellen Naturstoffe einen einmaligen Zugang, zellbiologische Prozesse zu manipulieren und zu beobachten, wie HCV davon beeinflusst wird. Für diese Zwecke sind durchaus auch die Verbindungen interessant, welche die Vermehrung von HCV steigern. Verstehen wir erst, welche Prozesse in der Zelle dafür verantwortlich sind, können wir in Zukunft Wege finden, dieses Zusammenspiel des Virus mit der Zelle für therapeutische Zwecke zu nutzen.

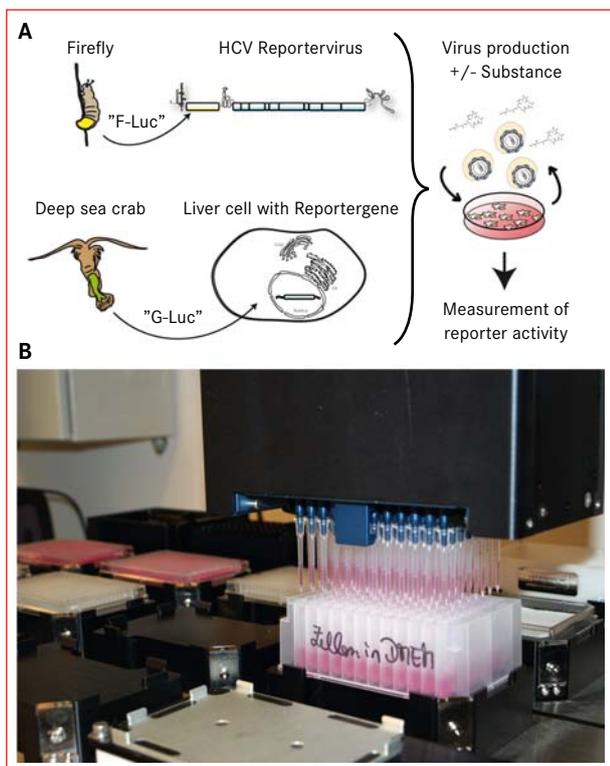


Abb. 4. HZI Pipettierroboter im S3* Sicherheitslabor zur Durchführung von Hochdurchsatz-Screenings. Grafik & Foto: Twincore

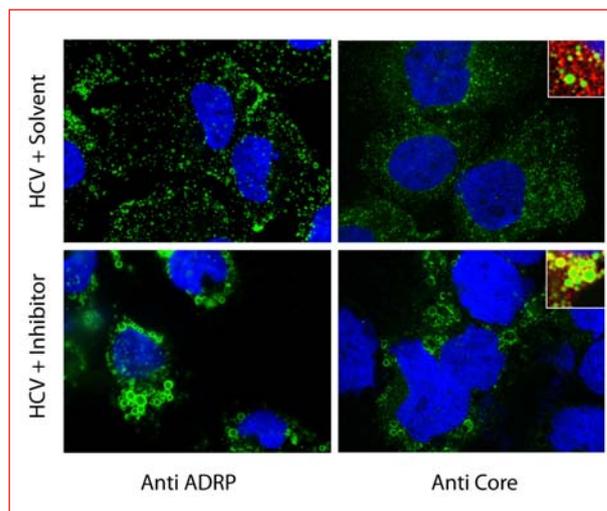


Abb. 5. Einfluss kleiner Moleküle mit antiviraler Wirkung gegen HCV auf die Bildung von lipid droplets in Leberzellen. HCV-infizierte Zellen wurden mit Solvens oder einem Inhibitor inkubiert. Lipid droplets wurden mit einem anti-ADRP Antikörper (links) oder einem Lipidfarbstoff grün gefärbt (kleines Bild). HCV-Core wurde mit einem core-spezifischen Antikörper nachgewiesen (rechts und rote Markierung im kleinen Bild). Inkubation mit dem Inhibitor führt zur Vergrößerung und Aggregation von lipid droplets sowie zur Anreicherung von HCV Core an deren Oberfläche.

Grafik: Twincore



Prof. Pietschmann und seine Arbeitsgruppe. Foto: Twincore/HZI



Thomas Pietschmann geboren 1971 in Würzburg, studierte Biologie mit Schwerpunkten in Biochemie, Tierphysiologie, Virologie und Immunbiologie an der Universität Würzburg und der Duke University (Durham, NC, USA). Nach Abschluss des Studiums 1996 erwarb er den Grad des Dr. rer. nat. in Biologie am Institut für Virologie der Universität Würzburg und arbeitete als Postdoc am Institut für Virologie in Mainz und in der Abteilung für Molekulare Virologie der Universitätsklinik Heidelberg. Dort etablierte Thomas Pietschmann eine unabhängige Forschergruppe, die sich mit der Morphogenese und dem Eintrittsmechanismus des Hepatitis-C-Virus beschäftigte. Ab 2006 wurde seine Gruppe durch ein Emmy Noether-Stipendium der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt. Im Frühjahr 2007 wurde er mit seiner Arbeitsgruppe an das TWINCORE berufen. Dort leitet er die Abteilung Experimentelle Virologie.



Sandra Ciesek geboren 1978 in Goslar, studierte in Göttingen und Hannover Medizin und promovierte mit Auszeichnung bei Prof. M. P. Manns und Dr. H. Wedemeyer in der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie der MHH. Für ihre Promotion erhielt Sandra Ciesek diverse Preise und arbeitet seitdem sowohl als Assistenzärztin in der Abteilung Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie, als auch als stipendiengeförderte Wissenschaftlerin am TWINCORE bei Prof. Thomas Pietschmann. Mit einer über einen DFG-Einzelantrag geförderten Stelle erforscht sie am TWINCORE den Einfluss von Cyclosporin A auf das Hepatitis-C-Nichtstrukturprotein NS2.



Eike Steinmann geboren 1978 in Bremen, studierte Biologie an der Leibniz Universität Hannover – mit dem Fokus auf Virologie, Mikrobiologie und Molekularbiologie. Nach einem DAAD (Deutscher Akademischer Austausch Dienst)-Stipendium für einen Aufenthalt an der Northeastern University in Boston fertigte er seine Diplomarbeit bei Prof. Herrler am Institut für Virologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover an. Für die Arbeiten zum PhD wechselte Eike Steinmann in die Abteilung für Molekulare Virologie der Universitätsklinik Heidelberg und forschte in der Gruppe von Prof. Bartenschlager an der Funktion des p7-Proteins im HCV-Replikationszyklus. Mit seinem Betreuer Prof. Thomas Pietschmann wechselte er dann an das TWINCORE. Seine Forschung konzentriert sich auf verschiedene Aspekte des HCV-Zusammenbaus und seiner Freisetzung, sowie die Suche nach neuen antiviralen Targets. Weiterhin untersucht er die Umweltstabilität und Empfänglichkeit des HCV für Desinfektionsmittel.

Literatur

1. Bartosch, B., Dubuisson, J., & Cosset, F. L. (2003) Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *Journal of Experimental Medicine* **197**, 633-642.
2. Berenguer, M., Prieto, M., San Juan, F., Rayon, J. M., Martinez, F., Carrasco, D., Moya, A., Orbis, F., Mir, J., & Berenguer, J. (2002) Contribution of donor age to the recent decrease in patient survival among HCV-infected liver transplant recipients. *Hepatology* **36**, 202-210.
3. Brown, R. S. (2005) Hepatitis C and liver transplantation. *Nature* **436**, 973-978.
4. Bürgel B, Friesland M, Koch A, Manns MP, Wedemeyer H, Weissenborn K, Schulz-Schaeffer WJ, Pietschmann T, Steinmann E & Ciesek S (2010) Hepatitis C virus enters human peripheral neuroblastoma cells - evidence for extra-hepatic cells sustaining hepatitis C virus penetration. *Journal of Viral Hepatology* Jun 23 [Epub ahead of print].
5. Ciesek, S., Friesland, M., Steinmann, J., Becker, B., Wedemeyer, H., Manns, M. P., Steinmann, J., Pietschmann, T., & Steinmann, E. (2010) How stable is the hepatitis C virus (HCV)? Environmental stability of HCV and its susceptibility to chemical biocides. *Journal of Infectious Diseases* **201**, 1859-1866.
6. Ciesek, S., Steinmann, E., Iken, M., Ott, M., Helfritz, F. A., Wappler, I., Manns, M. P., Wedemeyer, H., & Pietschmann, T. (2010) Glucocorticosteroids increase cell entry by hepatitis C virus. *Gastroenterology* **138**, 1875-1884.
7. Ciesek, S., Steinmann, E., Wedemeyer, H., Manns, M. P., Neyts, J., Tautz, N., Madan, V., Bartenschlager, R., von Hahn, T., & Pietschmann, T. (2009) Cyclosporine A inhibits hepatitis C virus nonstructural protein 2 through cyclophilin A. *Hepatology* **50**, 1638-1645.
8. Forman, L. M., Lewis, J. D., Berlin, J. A., Feldman, H. I., & Lucey, M. R. (2002) The association between hepatitis C infection and survival after orthotopic liver transplantation. *Gastroenterology* **122**, 889-896.
9. Gane, E. J., B. C. Portmann, N. V. Naoumov, H. M. Smith, J. A. Underhill, P. T. Donaldson, G. Maertens, and R. Williams. 1996. Long-term outcome of hepatitis C infection after liver transplantation. *New England Journal of Medicine* **334**:815-820.
10. Gentsch, J., Hinkelmann, B., Kaderali, L., Irschik, H., Jansen, R., Sasse, F., Frank, R., & Pietschmann, T. (2011). Hepatitis C virus complete life cycle screen for identification of small molecules with pro- or antiviral activity. *Antiviral Research* **89**(2), 136-148.
11. Lohmann, V., Körner, F., Koch, J. O., Herian, U., Theilmann, L., & Bartenschlager, R. (1999) Replication of sub-genomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* **285**,110-113.
12. Manns, M. P., Wedemeyer, H., & Cornberg, M. (2006). Treating viral hepatitis C: efficacy, side effects, and complications. *Gut* **55**, 1350-1359.
13. Pietschmann, T., Kaul, A., Koutsoudakis, G., Shavinskaya, A., Kallis, S., Steinmann, E., Abid, K., Negro, F., Dreux, M., Cosset, F. L., & Bartenschlager, R. (2006) Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **103**, 7408-7413.
14. Steinmann, J., Becker, B., Bischoff, B., Paulmann, D., Friesland, M., Pietschmann, T., Steinmann, J., & Steinmann, E. (2010) Virucidal activity of 2 alcohol-based formulations proposed as hand rubs by the World Health Organization. *American Journal of Infection Control* **38**, 66-68.
15. Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Murthy, K., Habermann, A., Krausslich, H. G., Mizokami, M., Bartenschlager, R., & Liang, T. J. (2005) Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nature Medicine* **11**, 791-796.



Die Alterung des Immunsystems: Probleme und Perspektiven

AUTOREN | Priv.-Doz. Dr. Eva Medina | AG Infektionsimmunologie | eme@helmholtz-hzi.de |
Dr. Dr. Luka Cicin-Sain | NG Immunalterung und Chronische Infektionen | lcs09@helmholtz-hzi.de

Wie alt ist alt? Wenn man die Menschheitsgeschichte zurückverfolgt, lag die durchschnittliche Lebenserwartung in der Steinzeit zwischen 20 und 35 Jahren. Ein Zeitraum, der gerade ausreicht, um sich fortzupflanzen und den Fortbestand der Menschheit sichern zu können. Gegen Ende des 19. und zu Beginn des 20. Jahrhunderts stieg die Lebenserwartung in den industrialisierten Ländern rasant an und verdoppelte sich nahezu in den vergangenen 100 Jahren. Die durchschnittliche Lebenserwartung beträgt heute ca. 75 Jahre bei Männern und bei Frauen über 80 Jahre, wobei sich dieser Trend weiter fortsetzt und nicht abzusehen ist, wo diese Entwicklung hinführen wird (Abbildung 1). Auch wenn die längere Lebenserwartung an sich erfreulich ist, bringt diese Entwicklung jedoch für den Einzelnen und die Gesellschaft neue Herausforderungen mit sich. Die steigende Zahl älterer Menschen wird von einer Reihe chronischer Krankheiten wie Alzheimer, Arthritis, Arteriosklerose und Diabetes begleitet. Ein gemeinsames Merkmal dieser Krankheitsbilder ist die entzündliche Pathogenese. Sie zeigt, dass sich während des Alterungsprozesses ein Ungleichgewicht unter den Immunfunktionen herausbildet, das auch als "Immunoseneszenz" bezeichnet wird. Diese altersbedingte Degeneration des Immunsystems ist für die erhöhte Prävalenz und den schwereren Verlauf von Infektionskrankheiten, sowie die geringe Wirksamkeit von Impfungen bei älteren Menschen verantwortlich. Bekannt ist, dass ältere Menschen gegenüber Krankheiten anfälliger sind (Gavazzi und Krause, 2002). In den entwickelten Industrieländern verursachen Grippe und Lungenentzündung ein Sechstel aller Todesfälle bei Menschen ab 65 (Stupka et al., 2009). Impfungen könnten dabei helfen, das erhöhte Mortalitätsrisiko durch Infekte bei älteren Menschen zu verringern. Jedoch geht bei älteren Menschen die durch die Impfung bedingte Schutzwirkung auch teilweise wieder verloren (Chen et al., 2009). Das Wissen um die grundlegenden Mechanismen der altersbedingten Immunfehlfunktion kann bei der Entwicklung von Behandlungsmethoden zur Verzögerung oder gar Beseitigung der schädlichen Auswirkungen der Immunoseneszenz sehr nützlich sein. Es wird einen Beitrag zur Verbesserung des Gesundheitsschutzes bei älteren Menschen und damit zur Verbesserung der "Gesundheit im Alter" leisten.

Mechanismen der Immunoseneszenz Der Alterungsprozess lässt sich als fortschreitender Abbau des homöostatischen Gleichgewichts eines Individuums beschreiben: Es wird immer schwieriger, auf Umweltstress zu reagieren und die Homöostase wieder herzustellen. Daher benötigt ein Wirt, je älter er wird, immer mehr Energie und Zeit zur Wiederherstellung der Homöostase und ist dadurch weniger widerstandsfähig als ein junges Individuum. Systeme, die einem Individuum die Fähigkeit verleihen, sich ständig an die Umgebung anzupassen, sind vom Alterungsprozess besonders betroffen. Dazu gehören etwa das Nervensystem, das die Anpassung an die unmittelbare physische Umgebung ermöglicht, oder das Immunsystem, das dafür sorgt, dass sich der Wirt an seine mikrobiologische Umgebung anpassen kann.

Dabei lässt sich das Immunsystem in den angeborenen Bereich, der im Wesentlichen die Monozyten, die Neutrophilen, die natürlichen Killerzellen und die dendritischen Zellen umfasst, und in den adaptiven Bereich unterteilen, der die B- und T-Lymphozyten umfasst. Das angeborene Immunsystem ermöglicht die sofortige Reaktion auf Pathogene, die mit bestimmten Molekularstrukturen (PAMP) in Verbindung stehen. Dabei erfolgt die Abwehr von Infekten durch eine selbständige Reaktion. Das adaptive Immunsystem dagegen reagiert pathogen-

spezifisch und ist in der Lage, sich an neue Pathogengruppen, die mit einem Infektionserreger in Verbindung stehen, zu erinnern und diese bei einer erneuten Infektion sofort wiederzuerkennen. Lymphozyten bilden eine Population von Millionen klonal diversifizierter Zellen, welche jeweils unterschiedliche wirtsfremde Molekulargruppen identifizieren können (Antigen). Sobald ein junger Lymphozytenklon ein neues Antigen erkennt, bildet er eine große Zellpopulation, die die Pathogene mit der entsprechenden Molekülgruppe aufspürt und neutralisiert. Nach Ausheilung einer Infektion verbleibt ein Teil dieser Lymphozytenklone in Form von Gedächtniszellen im Wirt, wodurch der Organismus dann bei einer erneuten Infektion gegen dieses Pathogen immun ist.

Prinzipiell kann der Alterungsprozess beide Bereiche des Immunsystems beeinträchtigen, wobei heute lediglich die Funktionsverluste des adaptiven Bereiches des Immunsystems umfassend dokumentiert sind. Über die altersbedingten Veränderungen des angeborenen Immunsystems liegen weit aus weniger Forschungsergebnisse vor, die sich zudem teilweise widersprechen (Nikolich-Zugich und Cicin-Sain, 2010). Eine ganze Reihe von Untersuchungen weist eine Verstärkung der Aktivität des angeborenen Immunsystems und der durch den Alterungsprozess bedingten Entzündungsvorgänge

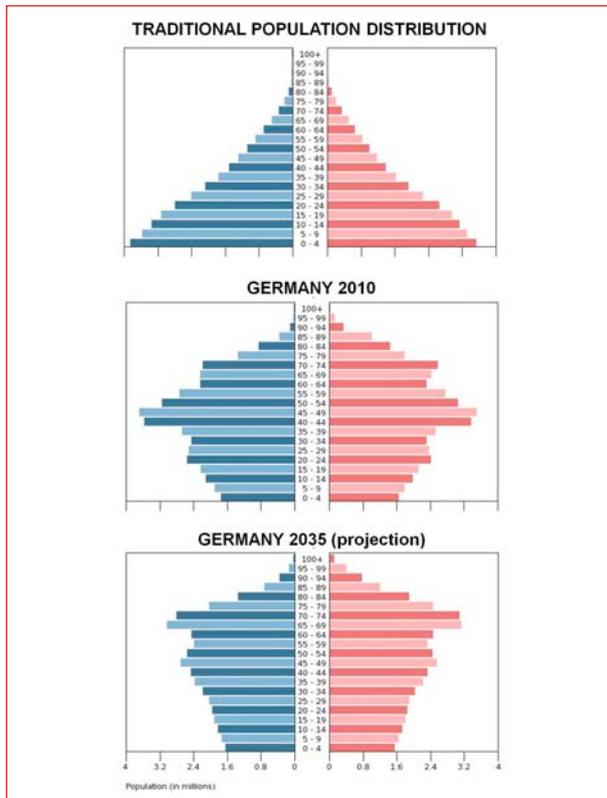


Abb. 1. Die männliche (blau) und die weibliche (rot) Altersstruktur der Bevölkerung eines Landes konnte traditionell in Form einer Pyramide wiedergegeben werden, in der die Mehrheit der Bevölkerung zu den jungen Jahrgängen gehörte. Für Deutschland ist dies aufgrund von Veränderungen der Altersstruktur heute nicht mehr möglich, die Verteilung hat die Form eines Pilzes angenommen. Falls sich dieser Trend fortsetzt, wird in 25 Jahren die Zahl der 65-75-Jährigen die größte Gruppe in der Altersstruktur der Bevölkerung ausmachen. Grafik: HZI

nach, ein treffenderweise als "Inflaming" bezeichneter Prozess (Franceschi und Bonafè, 2003). Allerdings ist unklar, ob diese verstärkte Aktivität auf die Kompensation einer immer schwächer werdenden Funktion des adaptiven Immunsystems oder auf eine intrinsische Erhöhung der Aktivität des angeborenen Immunsystems zurückzuführen ist.

Andererseits besteht Einigkeit darüber, dass der adaptive Bereich des Immunsystems durch den Alterungsprozess negativ beeinflusst wird. Das betrifft insbesondere die Immunantwort auf Infektionen bei Menschen im fortgeschrittenen Alter (Nikolich-Zugich und Rudd, 2010). Im Gegensatz dazu bleibt jedoch das Vermögen, sich an Pathogene und Impfstoffe zu erinnern, das bei jüngeren Organismen vorhanden ist, auch im fortgeschrittenen Alter weitgehend erhalten (Ammana et al., 2007). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die klonal diversifizierte, jungen Lymphozyten stärker als die klonal begrenzten Gedächtniszellen durch den Alterungs-

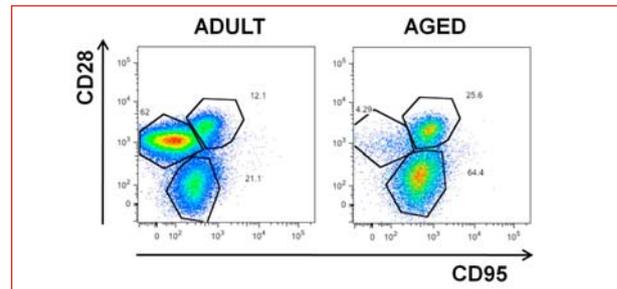


Abb. 2. Verlust natürlicher zytotoxischer T-Lymphozyten in älteren Personen (modifiziert nach Cicin-Sain et al, PNAS 2007). Die Population natürlicher Lymphozyten, charakterisiert durch einen niedrigen CD95- und einen hohen CD28-Wert, ist in jungen erwachsenen Rhesusaffen stets groß, nimmt aber mit zunehmendem Alter ab. Daraus resultiert ein relatives Anwachsen von Gedächtniszellsubtypen. Grafik: HZI

prozess beeinträchtigt werden. Damit ist der Verlust der klonalen Vielfalt im Bestand der Lymphozyten eine typische Änderung, die in engem Zusammenhang mit der Immunoseneszenz steht.

Die Ursachen der Immunoseneszenz sind vielfältig und noch nicht vollständig erforscht. Zu den bisher geklärten Faktoren der Immunalterung gehören die Rückbildung der Thymuszellen, der sich daraus ergebende Verlust an neu gebildeten jungen T-Zellen (Abbildung 2) sowie der metabolische – insbesondere der oxidative – Stress (Altmeyer und Hottiger, 2009). Bisher wenig erforscht ist die Frage, ob entzündliche Zustände die Immunalterung beschleunigen oder lediglich eine Folge der Immunoseneszenz darstellen. Und es konnte bisher noch nicht geklärt werden, welche Rolle chronische Infektionen bei der Immunalterung spielen (Virgin et al., 2009), ob längere Infektionen zur Immunalterung beitragen oder ob die Immunoseneszenz an sich chronische Infektionen bedingt. Antworten auf diese Fragen könnten durch experimentelle Modellierungen von Immunprozessen bei alternden Tieren geklärt gefunden werden.

Die Immunoseneszenz hat eine ganze Reihe klinischer Folgen. Bei älteren Menschen besteht eine deutlich erhöhte Suszeptibilität gegenüber Infektionen, die durch junge Lymphozytenpopulationen gesteuert werden, wie z.B. neue Grippeviren, Infektionen durch das West-Nil-Virus oder Pneumokokkeninfektionen. Dieses Problem wird dadurch verschärft, dass junge Zellpopulationen keinen entsprechenden Schutz bei der Impfung älterer Menschen aufbauen. Andererseits sind ältere Menschen auch anfälliger gegenüber einer Reihe von weiteren Erkrankungen, insbesondere gegenüber chronischen Entzündungsprozessen, wozu auch Arthritis, entzündliche Darmerkrankungen, Arteriosklerose oder Erkrankungen mit einer ausgeprägten entzündlichen Komponente wie Diabetes oder Alzheimer gehören. Unsere

Kenntnisse über die Veränderungen in den Zellen und auf molekularer Ebene, die mit zunehmendem Alter zu einer Abnahme der Immunfunktion führen, konnten in den letzten Jahren deutlich ausgebaut werden. Der nächste Schritt besteht nunmehr in der Durchführung klinischer Versuche, durch die Methoden entwickelt werden können, mit denen sich die Immunfunktion bei älteren Menschen verbessern lässt.

Hundertjährige als Musterbeispiel für Gesundheit im Alter

Hundertjährige, die *per definitionem* als sehr alte Menschen gelten, sind bei der Erforschung der maximalen Lebensspanne gut geeignete Probanden. Sie sind nicht nur sehr alt, sondern auch in einem verhältnismäßig guten mentalen und körperlichen Zustand. Früher ging man davon aus, dass nur sehr wenige Menschen das 100. Lebensjahr erreichen können, heute erreichen jedoch wesentlich mehr Menschen dieses hohe Alter. Publizierten Vorhersagen zufolge wird in naher Zukunft der Anteil der Menschen, die älter als 95 bzw. 100 Jahre sind, einen großen Teil der Bevölkerung ausmachen (Olshansky et al., 1990; Barinaga M, 1991). Hundertjährige sind ein gutes Beispiel dafür, wie man auch im Alter weitgehend gesund bleiben kann, denn diese Menschen konnten die meisten Krankheiten vermeiden bzw. überstehen, die für die Morbosität und Mortalität im fortgeschrittenen Alter verantwortlich sind. Um in der Lage zu sein, die wesentlichsten, altersbedingten Krankheiten zu verhindern oder hinauszuzögern, müssen Hundertjährige zwangsläufig über gut erhaltene und wirksame Immun- und Verteidigungsmechanismen, sowie über optimale Kombinationen zwischen einem angemessenen Lebensstil und entsprechenden genetischen Voraussetzungen (Franceschi und Bonafè, 2003) verfügen. Durch Untersuchungen an deren Immunsystemen wurden Parameter gefunden, die mit dem bei älteren Menschen in der Regel stattfindenden, fortschreitenden Verschleiß konform gehen (z.B. Verringerung der Anzahl der B- und T-Lymphozyten), während andere Parameter weitgehend intakt bleiben (z.B. Chemotaxis, Phagozytose). Ob anstelle der Umgebungseinflüsse und der genetischen Voraussetzungen eher diese Parameter dafür verantwortlich sind, dass einige Menschen ein so hohes Alter erreichen, bleibt jedoch noch zu klären. Daher sind Studien über Hundertjährige und insbesondere über solche, die sich einer guten Gesundheit erfreuen, nicht nur von großem biologisch-medizinischen Interesse, sondern können auch einen Beitrag zur Erforschung der Gene leisten, durch die die beschriebenen, altersbedingten Krankheiten vermieden werden können.

Tiermodelle zur Untersuchung der Immunoseneszenz

Ethische Bedenken schränken die Durchführung von Experimenten an Menschen erheblich ein. Daher stammen die meisten altersbezogenen Erkenntnisse aus Experimenten an Zellkulturen oder Tieren. Es wurden mehrere Tiermodelle für die Untersuchung der altersbedingten Auswirkungen auf das Immunsystem und die spezifischen Signalwege entwickelt, die sich nachweislich durch den Alterungsprozess verändern.

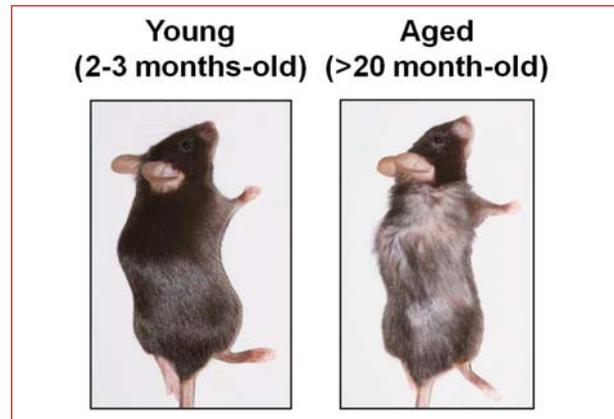


Abb. 3. Mausmodelle haben sich als sehr nützlich für das Studium von Altersprozessen sowie die Aufklärung der Frage, wieso es zu einer anwachsenden Anfälligkeit gegenüber Infektionen in zunehmendem Alter kommt, gezeigt. Fotos: HZI

Wirbellose Tiere erweisen sich für solche Studien als sehr geeignet, da sie in der Regel über kurze Zeitspannen mehrere Generationen durchlaufen, sehr kurze Lebensspannen haben und in großer Anzahl verfügbar sind. Jedoch ist die Übertragung der durch Untersuchungen an wirbellosen Tieren gewonnenen Erkenntnisse problematisch, da diese Tiere nur über ein angeborenes Immunsystem verfügen und bei ihnen somit die Komponenten des adaptiven Immunsystems nicht vorhanden sind. Das Fehlen der adaptiven Immunantwort hat jedoch den Vorteil, dass sich so die Auswirkungen des Alterns auf das angeborene Immunsystem untersuchen lassen – ohne die verwirrenden Interaktionen zwischen den angeborenen und adaptiven Immunmechanismen. Die am häufigsten für die Untersuchung von Alterungsprozessen eingesetzten wirbellosen Tierarten sind *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* (Kurz und Tan, 2004).

Anhand von Mausmodellen (Abbildung 3) konnten hingegen wichtige Informationen über die altersbedingten Änderungen an den adaptiven Immunmechanismen (Maue et al., 2009) gewonnen werden. Mit den Immunoseneszenz-Modellen wurden Mäuse mit Änderungen in der Telomerase-Aktivität, der Tumorsuppressionsfunktion, im oxidativen Stress, der Hormonexpression sowie in Bezug auf verschiedene andere Moleküle untersucht, die bei der Entwicklung und Differenzierung des Immunsystems und für die Lebensdauer eines Organismus eine Rolle spielen. Dabei wurden eine Reihe neuer Erkenntnisse zu grundlegenden Immunfunktionen und Zusammenhängen zwischen Zellnetzwerken und Signalwegen in Verbindung mit der Lebensdauer und der Immunfunktion gewonnen. Zudem ist das Mausmodell ein sehr nützliches Werkzeug zur Bewertung der Strategien gegen Immunalterungsprozesse, also die Prozesse, die Individuen im fortgeschrittenen Alter ermöglichen, besser auf Impfungen zu reagieren bzw. Pathogene erfolgreicher zu bekämpfen.

Eine wesentliche Einschränkung bei der Übertragung der mit dem Mausmodell erzielten Ergebnisse über die Immunalterung auf die Immunoseneszenz beim Menschen ergibt sich aus der relativ kurzen Lebensspanne von Mäusen (~2,5 Jahre). Eine geeignetere Alternative bieten Untersuchungen an älteren, nicht-menschlichen Rhesusprimaten (NHP), die dem Menschen in phylogenetischer Hinsicht und auch bezüglich der Lebenszeit (durchschnittliche Lebenserwartung bei Rhesusaffen ~25 Jahre) wesentlich ähnlicher sind. Andererseits sind die Möglichkeiten der Forschung anhand von Primatenmodellen aufgrund ethischer Bedenken und technischer Einschränkungen begrenzt. Bei einem Experiment lässt sich nur eine begrenzte Anzahl von NHP unterbringen und einsetzen. Hinzu kommt, dass die ausgefeilten genetischen Modelle, die für Mausexperimente frei verfügbar sind, praktisch nicht auf Wirte mit einer längeren Lebensspanne übertragbar sind. So bieten verschiedene Modelle unterschiedliche Vorteile bei der Untersuchung der Immunoseneszenz. Die Ermittlung der jeweiligen Vor- und Nachteile der einzelnen Untersuchungsmodelle und deren Einsatz im entsprechenden Kontext sind für den Erfolg der Forschung von größter Bedeutung.

Immunverjüngung: mehr als nur ein Traum? Ein tieferes Verständnis der in den Zellen sowie auf molekularer Ebene stattfindenden Änderungsvorgänge, die die Alterung des Immunsystems bedingen, ist die Voraussetzung für die Entwicklung neuer Methoden zur Umkehrung dieses Prozesses. Da die Immunoseneszenz im Zusammenhang mit einer verminderten Produktion von jungen B- und T-Zellen steht, kann eine Wiederbelebung des Immunsystems mit neuen B- und T-Zellen aus universellen Stammzellen eine Möglichkeit sein, die Immunoseneszenz bei älteren Patienten zurückzubilden. Voraussetzung dafür ist, dass sich die adulten Körperzellen zu universellen Stammzellen umprogrammieren lassen, um daraus junge Lymphozyten zu bilden. Eine weitere, im Tiermodell getestete, vielversprechende Strategie besteht in der Wiederherstellung der Funktionsfähigkeit der Thymuszellen im Epithel. Der Abbau der Thymuszellen wird nach der Behandlung mit Keratinozyten-Wachstumsfaktoren (Min et al., 2007) verzögert. Eine weitere Möglichkeit zur Verjüngung des gealterten Immunsystems ist die Beeinflussung der Produktion von Lymphozyten zur Erhöhung der Anzahl der jungen B- und T-Zellen, die sich in sekundären lymphoiden Organen ansiedeln. Die erhöhte Anzahl von B- und T-Zellen im Kreislauf bewirkt bei älteren Patienten, dass deren Immunsystem auf neue oder von früher her bekannte Antigene besser reagieren kann. Es gibt auch Empfehlungen für verschiedene Eingriffe und Übungen, die die Immunfunktion bei älteren Patienten wiederherstellen sollen. Die Befunde einiger, jedoch nicht aller, Studien untermauern die These, dass die Immunoseneszenz durch Übungen eingedämmt und dadurch eine wirksame Therapie für die Wiederherstellung der Immunfunktion bei älteren Menschen durchgeführt werden kann. Der Immunoseneszenz könnte auch entgegen gewirkt werden, indem die Belastung durch Antigene, die von

Pathogenen, wie dem Grippevirus oder dem Cytomegalovirus (CMV) ausgehen, reduziert wird. Damit müssten sich die systematische Suche nach chronischen viralen Infektionen bei älteren Menschen sowie die Entwicklung sicherer Verfahren zur Ausmerzungen solcher Krankheiten mit hoher Wahrscheinlichkeit auch günstig auf die Lebenserwartung auswirken. Da es beim Alterungsprozess starke Unterschiede zwischen den einzelnen Individuen gibt, ist es wichtig, Methoden zu entwickeln, anhand derer sich die Patienten ermitteln lassen, bei denen durch eine immunmodulatorische Behandlung die besten Behandlungsergebnisse erzielt werden können. Daher wäre es von Vorteil, wenn einfache Biomarker zur Verfügung stünden, mit denen sich die Wirkung auf die Alterung des Immunsystems ermitteln ließen. Auf diesem Gebiet kündigen sich bereits die ersten Erfolge an.

Altersforschung am HZI Für die Altersforschung am HZI sind zurzeit zwei Arbeitsgruppen zuständig: Die Arbeitsgruppe Infektionsimmunologie (INI) und die Arbeitsgruppe Immunalterung und Chronische Infektionen (IMCI). Die Forschungstätigkeit dieser Arbeitsgruppen konzentriert sich dabei auf die Identifizierung von altersbedingten Änderungen der Immunfunktionen. Das ist die Basis für die Entwicklung von Behandlungsstrategien zur Verzögerung bzw. Verhinderung des Abbaus der Leistungsfähigkeit des Immunsystems. Unter Verwendung eines Mausmodells zur Alterungsforschung haben die Wissenschaftler der Arbeitsgruppe Infektionsimmunologie spezifische Beeinträchtigungen der Immunfunktion untersucht, die zu einer altersbedingten, erhöhten Suszeptibilität gegenüber Infektionen mit *Streptococcus pyogenes* (Goldmann et al., 2010) führen. Dieses Pathogen ist die Hauptursache für schwere Infektionen, die bei älteren Menschen lebensbedrohlich sein können. Dabei wurde herausgefunden, dass, ähnlich wie beim Menschen, die Jungtiere

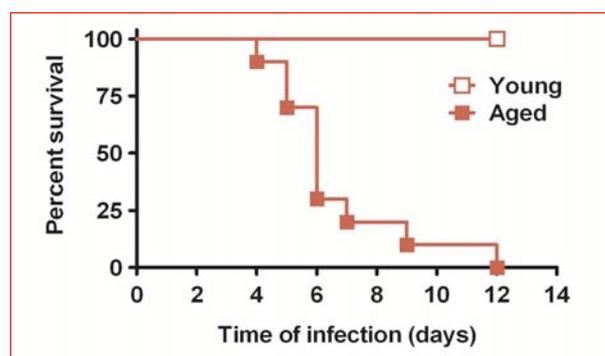


Abb. 4. Mäuse zeigen ebenso wie Menschen einen altersbedingten Verlust der Resistenz gegenüber *Streptococcus pyogenes*. Die Abbildung zeigt, dass junge Mäuse *S. pyogenes*-Infektionen gut überlebten (offene Symbole), während alte Tiere sehr empfindlich auf diese Infektion reagierten und alle Mäuse innerhalb von 2 Wochen nach der Infektion starben (geschlossene Symbole). Grafik: HZI

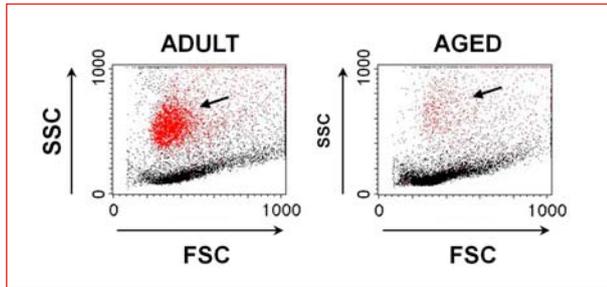


Abb. 5. Gewebe-Makrophagen sind wichtige Zellen im Kampf gegen *S. pyogenes*-Infektionen. Die Abbildung zeigt, dass ältere Mäuse eine signifikant geringe Anzahl an vorhandenen Gewebe-Makrophagen (s. Pfeil) aufwiesen als junge Tiere. Dies könnte einer der Gründe für eine erhöhte Empfindlichkeit älterer Mäuse gegenüber *S. pyogenes*-Infektionen sein. Grafik: HZI

im Alter von zwei bis drei Monaten in der Lage sind, diese Infektion erfolgreich abzuwehren, während die älteren Mäuse (älter als 20 Monate) auch dann starben, wenn sie lediglich mit einer geringeren Menge an Bakterien infiziert wurden (Abbildung 4).

Ein weiterer Forschungsschwerpunkt der Arbeitsgruppe ist die Erforschung der von der Immunoseneszenz betroffenen Immunmechanismen, die dafür verantwortlich sind, dass ältere Mäuse gegenüber diesen bakteriellen Infektionen anfälliger sind. Im Mittelpunkt der Untersuchungen stehen Makrophagen, da diese Zellen die vorderste Verteidigungslinie bei der Abwehr bakterieller Infektionen bilden. Es wurde beispielsweise herausgefunden, dass bei älteren Mäusen im Vergleich zu Jungtieren die Anzahl der im Gewebe vorhandenen Makrophagen deutlich vermindert ist (Abbildung 5). Da die Anzahl der Makrophagen in den Organen von der Produktion eines spezifischen Wachstumsfaktors (M-CSF) abhängt, haben die Wissenschaftler postuliert, dass, wenn durch eine Behandlung mit diesem Wachstumsfaktor eine Aufstockung der im Gewebe angesiedelten Makrophagen bei älteren Mäusen erzielt werden kann, sich auch deren Widerstandsfähigkeit gegenüber Infektionen verbessern müsste. Eine Behandlung mit M-CSF hat in der Tat dazu geführt, dass sie widerstandsfähiger wurden und die Infektion besser abwehren konnten. Das Ergebnis dieser Untersuchungen zeigt, dass eine wiederholte prophylaktische Verabreichung von M-CSF dazu beitragen kann, den Makrophagenbestand bei älteren Patienten aufrechtzuerhalten und damit die Leistungsfähigkeit des Immunsystems zu verbessern.

Eine neu eingerichtete Arbeitsgruppe für Immunalterung und chronische Infektionen beschäftigt sich mit den Mechanismen und Auswirkungen der Immunalterung. In einer vor kurzem durchgeführten Gemeinschaftsstudie konnte die Arbeitsgruppe nachweisen, dass ältere Rhesusaffen

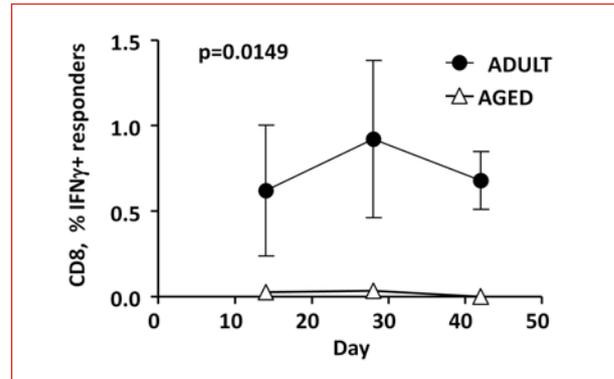


Abb. 6. Eine Impfung mit abgeschwächten Pockenviren (modifizierter Vaccinia-Ankara-Stamm) führte bei erwachsenen Rhesusaffen zu einer messbaren Immunantwort von im Gewebe vorhandenen zytotoxischen T-Lymphozyten, jedoch nicht mehr bei alten Tieren. Diese Verminderung der Immunantwort steht in einem direkten Verhältnis zu dem Rückgang natürlicher Zellen in alten Probanden (s.a. Abb. 2). Grafik: HZI

(~18-25 Jahre) signifikant schwächere Immunreaktionen auf Impfungen zeigen als Tiere im mittleren Erwachsenenalter (~7-10 Jahre). Diese Reaktion war anhand der relativen und absoluten Anzahl von jungen Zellen im Blut der Affen vorhersagbar (Cicin-Sain et al., 2010) (Abbildung 6). Die Impfung wurde mit einem abgeschwächten Virus (modifiziertes Vacciniavirus Ankara – MVA) durchgeführt, das auch für Impfungen bei älteren Patienten in der Praxis geeignet ist. Interessanterweise korrelierte die Anzahl der jungen Zellen mit der Reaktion auf den Impfstoff nur dann, wenn der Anteil der jungen Zellen im Gesamtlymphozytenpool den Schwellwert von etwa 20% unterschritt. Damit schien eine Vorhersage der Reaktionsintensität auf den Impfstoff anhand der klonalen Vielfalt junger T-Zellen nur dann möglich zu sein, wenn die Klonalität ein einschränkender Faktor war. In einer für die Veröffentlichung eingereichten Folgestudie zeigen die Autoren, dass dieselbe Population von Rhesusaffen heftige Memory-Reaktionen auf Pathogene entwickeln kann, denen sie in früheren Lebensabschnitten ausgesetzt waren (Rhesus Cytomegalovirus – RhCMV). Die Arbeitsgruppe untersucht jetzt die Auswirkungen langandauernder Infektionen auf chronisch infizierte Wirte und ihren Beitrag zum Immunalterungsprozess.

Schlussfolgerungen Derzeit gilt der Alterungsprozess immer noch als unvermeidbare Endphase im Leben eines Individuums. Durch die ständige Erweiterung unseres Wissens über die den Alterungsprozess und die Immunoseneszenz regulierenden Mechanismen können wir viele unterschiedliche Strategien zur Eindämmung und Verzögerung dieser Vorgänge entwickeln, um jedem ein möglichst langes Leben in Gesundheit zu ermöglichen.



Eva Medina ist Leiterin der Infektionsimmunologie Forschungsgruppe am HZI. Eva Medina schloss 1987 ihr Studium der Biologischen Wissenschaften an der Universität von Sevilla (Spanien) ab und erwarb den Grad des PhD 1990 an der „Medical School of Seville“. Von 1991 bis 1993 arbeitete sie als Postdoktorandin am Institut für Immunologie der „Royal Free Hospital School of Medicine“ in London. 1993 nahm sie eine Postdoktorandenstelle am „The Trudeau Institute“ in New York an und untersuchte dort verschiedene Aspekte der Wirtsanwort auf Infektionen mit *Mycobacterium tuberculosis*. Von 1997 bis 2004 arbeitete sie als Postdoktorandin am Institut für Mikrobielle Pathogenese und Impfstoff-Forschung am HZI. 2004 wurde Eva Medina zur Leiterin der Forschungsgruppe Infektionsimmunologie am HZI ernannt.



Luca Cicin-Sain, geboren 1972, ist Leiter der Nachwuchsforschergruppe Immunalterung und Chronische Infektionen am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (HZI). Er studierte an der Universität von Rijeka in Kroatien und schloss sein Studium 1996 ab. Den Grad des PhD erwarb er 2006. Von 2001 bis 2004 arbeitete er am „Max von Pettenkofer Institut“ in München. Anschließend ging er an die „Oregon Health and Science University“ in Portland, USA, wo er bis 2007 als DFG-Postdoktorand und bis 2009 als Assistenzprofessor tätig war. 2009 kehrte er nach Deutschland zurück und fing am HZI in seiner jetzigen Position an. 2011 wurde ihm der „European Research Council Starting Grant“ zuerkannt, um seinen Forschungsschwerpunkt auf die molekularen und zellulären Mechanismen der herpesviralen antigenen Induktion und die Effekte von persistenten Infektionen auf Immunhomöostase und -alterung auszuweiten.

Literatur

Altmeyer, M., & Hottiger, M. O. (2009) Poly(ADP-ribose) polymerase 1 at the crossroad of metabolic stress and inflammation in aging. *Aging (Albany NY)* **1**(5), 458-69.

Amanna, I. J., Carlson, N. E., & Slifka, M. K. (2007) Duration of humoral immunity to common viral and vaccine antigens. *New England Journal of Medicine* **357**(19), 1903-15.

Barinaga, M. (1991) How long is the human life-span? *Science* **254**(5034), 936-8.

Chen, W. H., Kozlovsky, B. F., Effros, R. B., Grubeck-Loebenstein, B., Edelman, R., & Sztein, M. B. (2009) Vaccination in the elderly: an immunological perspective. *Trends in Immunology* **30**(7), 351-9.

Cicin-Sain, L., Smyk-Paerson, S., Currier, N., Byrd, L., Koudelka, C., Robinson, T., Swarbrick, G., Tackitt, S., Legasse, A., Fischer, M., Nikolich-Zugich, D., Park, B., Hobbs, T., Doane, C. J., Mori, M., Axthelm, M. T., Lewinsohn, D. A., & Nikolich-Zugich, J. (2010) Loss of naive T cells and repertoire constriction predict poor response to vaccination in old primates. *Journal of Immunology* **184**(12), 6739-45.

Franceschi, C., & Bonafè, M. (2003) Centenarians as a model for healthy aging. *Biochemical Society Transactions* **31**(2), 457-61.

Gavazzi, G., Krause, K. H. (2002) Ageing and infection. *Lancet Infectious Diseases* **2**(11), 659-66.

Goldmann, O., Lehne, S., & Medina, E. (2010) Age-related susceptibility to *Streptococcus pyogenes* infection in mice: underlying immune dysfunction and strategy to enhance immunity. *Journal of Pathology* **220**(5), 521-9.

Kurz, C. L., & Tan, M. W. (2004) Regulation of aging and innate immunity in *C. elegans*. *Aging Cell* **3**(4), 85-93.

Maue, A. C., Yager, E.J., Swain, S. L., Woodland, D. L., Blackman, M. A., & Haynes, L. (2009) T-cell immunosenescence: lessons learned from mouse models of aging. *Trends in Immunology* **30**(7), 301-5.

Min, D., Panoskaltis-Mortari, A., Kuro-O., M., Holländer, G. A., Blazar, B. R., & Weinberg, K. I. (2007) Sustained thymopoiesis and improvement in functional immunity induced by exogenous KGF administration in murine models of aging. *Blood* **109**(6), 2529-37.

Nikolich-Zugich, J. & Cicin-Sain, L. (2010) Aging of the Immune System Across Different Species. In: *Comparative Biology of Aging* (Wolf, N., ed.), Springer Science and Business Media, New York, pp 232-249.

Nikolich-Zugich, J., & Rudd, B. D. (2010) Immune memory and aging: an infinite or finite resource? *Current Opinion in Immunology* **22**, 535-40.

Olshansky, S. J., Carnes, B. A., & Cassel, C. (1990) In search of Methuselah: estimating the upper limits to human longevity. *Science* **250**(4981), 634-40.

Stupka, J. E., Mortensen, E. M., Anzueto, A., & Restrepo, M. I. (2009) Community-acquired pneumonia in elderly patients. *Aging Health* **5**(6), 763-774.

Virgin, H. W., Wherry, E. J., & Ahmed, R. (2009) Redefining chronic viral infection. *Cell* **138**(1), 30-50.



Neuartige Nanopartikel setzen Impfstoffe frei

KORRESPONDIERENDER AUTOR | Prof. Dr. Claus-Michael Lehr | Abteilung für Wirkstoff-Transport, Helmholtz-Institut für Pharmazeutische Forschung Saarland – HIPS | cle09@helmholtz-hzi.de | Institut für Biopharmazie und Pharmazeutische Technologie, Universität des Saarlandes, Saarbrücken | lehr@mx.uni-saarland.de

CO-AUTOREN | Dr. Steffi Hansen | Arbeitsgruppe Transdermaler Wirkstofftransport – HIPS | Prof. Dr. Ulrich F. Schäfer | Institut für Biopharmazie und Pharmazeutische Technologie, Universität des Saarlandes, Saarbrücken | Prof. Dr. Dr. Carlos A. Guzmán | Abteilung für Vakzinologie und Angewandte Mikrobiologie – HZI

Etwa ein Drittel der jährlichen Todesfälle weltweit sind auf Infektionskrankheiten zurückzuführen. Darüber hinaus sind Krankheitserreger auch direkt an der Entstehung von Krebs und anderen chronischen Erkrankungen beteiligt. Patienten, die schon durch Vorerkrankungen geschwächt sind (z.B. Traumata, Herz-Kreislauf- oder Atemwegserkrankungen), versterben letztlich häufig infolge von Infektionen.

Strategien zur Vermeidung und Therapie von Infektionskrankheiten sind folglich von höchster Wichtigkeit. Impfungen sind hierbei immer noch die kostengünstigste Option. Die Möglichkeit, Impfungen sowohl gegen infektiöse als auch nicht-infektiöse Erkrankungen einzusetzen, macht sie zu einem therapeutischen Instrument von höchstem Interesse. Bei den heutzutage verwendeten Impfstoffen handelt es sich um klassische, lebende, abgeschwächte Erreger und um inaktivierte Pathogene. Aufgrund der hohen Komplexität dieser Moleküle kann jedoch die Qualität zwischen den Produktionschargen sehr variabel sein, und sie können zudem schwere Nebenwirkungen auslösen. In den letzten Jahren wurde die Gruppe der „Subunit“-Vakzine in den Markt eingeführt. Diese Impfstoffe basieren auf einem genau definierten Bruchstück des jeweiligen Antigens, das einen wirksamen Schutz auslöst. Weitere Fortschritte im Bereich der „Genomics“ und „Proteomics“ haben eine Vielzahl weiterer potenzieller Zielstrukturen und -antigene identifiziert. Hierzu zählen rekombinante Proteine, synthetische Peptide, Kohlenhydrate, Lipide und DNA.

Die klassischen Impfstoffe lösen in der Regel eine sehr starke Immunantwort aus, bedingt durch die komplexe Molekülstruktur des Antigens. Außerdem haben einige pathogen-assoziierte Bestandteile einen adjuvanten Effekt. Aufgereinigte Antigene aus „Subunit“-Vakzinen hingegen lösen für gewöhnlich nur eine sehr schwache Reaktion aus, so dass dem Impfstoff Adjuvantien zur Verbesserung der Immunantwort zugefügt werden müssen. Diese Adjuvantien (i) verstärken zum einen die ausgelöste Immunantwort, (ii) senken damit die benötigte Menge an Antigen und (iii) verkürzen die Zeit bis zum Eintreten des Impfschutzes. Zum anderen kann die Art und Stärke der Immunantwort beeinflusst werden. Letztlich kann durch adjuvantierte Impfstoffe ein lang anhaltendes, immunologisches Gedächtnis geschaffen werden, ohne dass mehrmalige Auffrischimpfungen notwendig sind.

Impfungen über die Haut? Gemeinsam ist allen etablierten und innovativen Antigenen, dass sie instabil und nur sehr schlecht permeabel sind, wenn sie in ihrer nativen Form

auf die Haut aufgebracht werden. Dies erfordert innovative Lösungen, die den Wirkstofftransport ermöglichen, das heißt geeignete Arzneistoffträgersysteme, Formulierungen oder andere Methoden, die eine Stabilisierung und Permeation ermöglichen. Die meisten Impfungen werden heutzutage immer noch über eine intradermale oder subkutane Injektion verabreicht. Allerdings sind hiermit neben der schlechten Akzeptanz der Patienten auch Sicherheitsrisiken (z.B. Infektionen) verbunden. Darüber hinaus muss die Applikation durch besonders geschultes Personal erfolgen. Hinzu kommt, dass der Impfstoff die Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) der Haut durch die Injektion nicht optimal erreichen kann. Dies sind die relevanten Zielzellen, welche die naiven T-Zellen induzieren und nachfolgend zur Bildung eines immunologischen Gedächtnisses führen. In der Mus-



Abb. 1. Penetration von Methyleneblau in Schweinehaut. Der Farbstoff dringt tief in den Haarfollikel ein. Foto: HIPS/HZI

kulatur sind solche Zellen nur in begrenzter Zahl vorhanden, wohingegen sie in der Haut in großer Zahl zu finden sind. Bei den APZ der Haut handelt es sich um dendritische Zellen der Dermis, sowie Langerhanszellen, die sich in der lebenden Epidermis befinden und sich in besonderem Maße um die Haarfollikel anreichern. Das Immunsystem der Haut erscheint somit als sehr attraktives Target, da hier die APZ mittels chemischer, mechanischer oder nanotechnologischer Hilfsmittel direkter erreicht werden können. Es wurde gezeigt, dass durch intradermale Immunisierung eine starke mukosale sowie systemische Immunantwort und auch ein Schutz gegen Virusinfektionen erreicht wurde.^{1,2}

Gleichzeitig stellt die Haut, insbesondere die Hornschicht, einen nahezu perfekten Schutz gegen das Eindringen von Chemikalien, Pathogenen aber auch von Therapeutika dar, die topisch auf die Haut appliziert werden. Die hochkompakte Struktur des *Stratum corneum*, bei dem sich hydrophile und lipophile Bereiche abwechseln, ist nur für kleine, nicht geladene Moleküle mit mäßiger Lipophilie bis zu einem gewissen Grad permeabel. Die Anwendung reiner Antigene auf der Haut ist nahezu unmöglich, da diese in hohem Maße instabil sind. Darum werden dringend innovative Systeme benötigt (z.B. Transportsysteme oder Formulierungen), die das Antigen stabilisieren und eine Permeation in die Haut erleichtern. Verschiedene Transportwege wurden bereits identifiziert, auf denen diese kleinen Moleküle über passive Diffusion in die Haut eindringen können.

Dazu gehören der inter- und der transzelluläre Weg wie auch die Permeation über die Hautanhangsgebilde, wie Haarfollikel und Poren.^{3,4} Letzterer ist von besonderer Bedeutung für die Invasion von größeren Molekülen, da hier eine Umgehung des *Stratum corneum* möglich ist. Verhornte Zellen kleiden lediglich etwa das obere Drittel des Haarfollikels aus, während der untere Teil lediglich mit einem Epithelium und „Tight Junctions“ ausgestattet ist. Die Langerhanszellen, die sich um die Haarfollikel anreichern, stellen somit in diesen Bereichen, wo die mechanische Barriere geschwächt ist, eine zweite immunologische Barriere dar. Obwohl die Langerhanszellen nur etwa 1% der gesamten Zellpopulation der Haut ausmachen, bedecken sie eine Fläche von etwa 20%, was durch ihre horizontale Ausrichtung und ihre langen, miteinander verzahnten Fortsätze ermöglicht wird.²

Transdermale Vakzination – Innovative Ansätze Derzeit wird eine Reihe von Ansätzen verfolgt, um Antigene über die Haut zu transportieren. Neue Technologien, mit denen Impfstoffmoleküle in die Epidermis und dort gezielt zu den APZ gebracht werden können, befinden sich in der Entwicklung. Durch den Einsatz Membran-permeabilisierender Substanzen konnte zusammen mit hohen Dosen von Antigenen eine signifikante Immunantwort hervorgerufen werden – beispielsweise durch Cholera-toxin, in Form von Pflastern.⁵



Abb. 2. Penetration von Methyleneblau in Mäusehaut. Der Farbstoff dringt tief in die lebenden Hautschichten und die Haarfollikel ein. Foto: HIPS/HZI

Zu den neuen Ansätzen, die die transdermale Verabreichung von DNA- und Proteinimpfstoffen ermöglichen sollen, zählen mechanische Applikationssysteme wie Mikronadeln⁶, „Gene gun“ (Genkanone) oder „PowderJet“ (Pulverinjektor)⁷, sowie auch andere Membran-permeabilisierende Verfahren wie Elektroporation, Ionotophorese und Dermabrasion.⁸

In einer klinischen Phase-1-Studie wurden 11 gesunde Probanden auf zwei Wegen mit dem normalen saisonalen Grippeimpfstoff immunisiert. Der Grippeimpfstoff wurde zum einen konventionell intramuskulär injiziert und zum anderen nach einer Schwächung der Hornschichtbarriere topisch auf einer Fläche von 16 bzw. 32 cm² am Oberarm aufgetragen. Zuvor wurde von der Applikationsstelle ein Großteil der Hornschicht sowie der Follikelinhalt mittels Sekundenkleber sowie Büroklebefilmabrisse entfernt. Die Forscher berichteten, dass diese Prozedur insgesamt gut vertragen wurde und nur bei einer Person zu einer leichten Rötung führte. Die Immunantwort war vergleichbar mit der nach intramuskulärer Injektion, wobei die transkutan immunisierten Probanden zusätzlich zur CD4+ T-Zellantwort auch eine CD8+ T-Zellantwort zeigten.⁹ Bei den Probanden, denen die Impfung auf klassische Weise intramuskulär verabreicht wurde, fehlte die CD8+ T-Zellantwort.

Das gemeinsame Prinzip der genannten Methoden ist, dass die effektive *Stratum corneum*-Barriere geschwächt wird und die APZ leichter zugänglich werden. Es wurde außerdem die Hypothese aufgestellt, dass durch die mechanische Einwirkung ein zusätzlicher Reiz auf das Gewebe ausgeübt wird, der zu einer unspezifischen Aktivierung der Immunzellen im Sinne eines leichten adjuvanten Effekts führt. Dieses Prinzip wurde bereits in der Vergangenheit für eine effektive Immunisierung genutzt. Bei der Pockenimpfung werden Kuhpockenerreger in die Haut eingeritzt, was eine effektive und ausgeprägte Immunantwort auslöst.

Eine Reihe dieser permeabilitätsverbessernden Methoden wurde außerdem zusammen mit innovativen Formulierungen von Vakzinen getestet, um eine zusätzliche Verbesserung der Immunantwort zu erzielen, das Risiko für das Auftreten von Nebenwirkungen zu minimieren und die applizierten Dosen senken zu können. Verschiedene Transportvehikel wie beispielsweise Liposomen, Transferosomen, Nano- und Mikropartikel, sowie virale Vektoren wurden bereits im Mäuseversuch getestet.² Es konnte gezeigt werden, dass Mikropartikel mit einer Größe von weniger als 5 µm in eine Vielzahl von phagozytoseaktiven Zellen aufgenommen werden.¹⁰ Für den Einsatz kleinerer Partikel, deren Größen im Submikrometerbereich liegt, liegen – abhängig von Art der Partikel, Art des Antigens, Applikationsroute und Studienendpunkt – widersprüchliche Ergebnisse hinsichtlich ihrer Aufnahme durch APZ vor. Es gibt Hinweise, dass Nanopartikel vermehrt in APZ aufgenommen werden, was vermuten lässt, dass sie besser für die Induktion einer Immunantwort geeignet sind als Mikropartikel.¹¹ Zusätzlich wurde gezeigt, dass die Partikelgröße die ausgelöste Immunreaktion beeinflussen kann. Viruspartikel induzierten sowohl eine IFN-γ als auch eine zellbasierte Typ-1-Reaktion, wohingegen größere Partikel eher für eine Typ-2-Reaktion verantwortlich waren.¹²

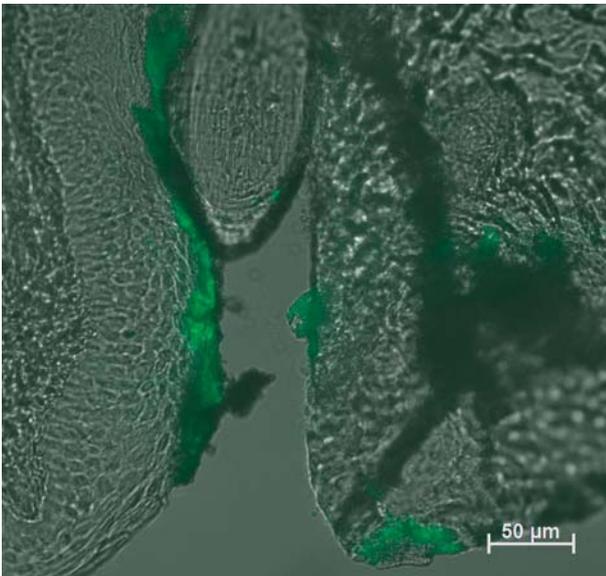


Abb. 3. Überlagerung einer Transmissions- und einer Fluoreszenzaufnahme eines Querschnitts durch Haut vom Schweineohr. Auf das Ohr wurden zuvor fluoreszenzmarkierte Nanopartikel (ca. 500 nm, grün) aufgetragen. Diese sammeln sich in der Öffnung eines Haarfollikels an. Foto: HZI

Es bleibt festzuhalten, dass Strategien zur transdermalen Vakzinierung, bei denen die Barrierefunktion der Haut für eine signifikante Zeit herabgesetzt wird, problematisch bleiben, da hiermit Eintrittspforten für Pathogene geschaffen werden. Dadurch sind diese Methoden ungeeignet für eine Anwendung in Ländern mit problematischen hygienischen Bedingungen. Gleichzeitig müssen sichere Alternativen verstärkt erforscht werden, bei denen die Hornschicht der Haut intakt bleibt. Hier scheint der Weg über die Hautanhangsgebilde, insbesondere die Haarfollikel, eine interessante Möglichkeit, um das *Stratum corneum* zu umgehen und die Langerhanszellen direkt zu erreichen.

Entwicklung von pollenmimetischen Impfstoffpartikeln

Wissenschaftler am HIPS und an der Universität des Saarlandes konnten kürzlich zeigen, dass Nanopartikel sich selektiv in der Haarfollikelöffnung anreichern.¹³ Diese Nanopartikel bestanden aus dem bioabbaubaren und biokompatiblen Polymer Polymilchsäure co-Glykolsäure (PLGA) und enthielten Polyvinylalkohol als Stabilisator.

Sowohl eine wässrige Suspension als auch eine Gelformulierung, die beide in exzidierte Schweineohren einmassiert wurden, drangen tiefer in die Haarfollikel ein als eine wässrige Lösung, die mit vergleichbarer Intensität appliziert wurde. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass es sich hierbei um einen passiven Targetingeffekt handelt, der auf die Größe der Nanopartikel zurück zu führen ist. Wir konnten außerdem zeigen, dass diese Partikel verschiedene eingeschlossene Verbindungen wieder freisetzen können und diese dann in das *Stratum corneum* eindringen.

Der Transport der Impfstoffantigene zu den APZ kann über die transfollikuläre Route als sehr attraktiv und sicher bezeichnet werden. Die Haarfollikel sind außerdem ein exzellentes Reservoir, da es nur sehr langsam zu einem Abtransport der Antigene durch Haarwuchs und Talgproduktion kommt.¹⁶

Tatsächlich ist die Aktivierung der APZ über die transfollikuläre Route durch Antigene ein alltäglicher Prozess, der im Rahmen der allergischen Kontaktdermatitis auftritt. Zum Beispiel handelt es sich bei Blütenpollen um Mikropartikel, die sich im Bereich der Follikelöffnung, der Talgdrüsen oder der Dermatoglyphen (Hautfalten) anreichern. Die Antigenfreisetzung aus den Pollen wird schließlich durch Feuchtigkeit (z.B. Schweiß auf der Haut) ausgelöst. Die Idee ist daher, den pollenvermittelten Transport von Allergenen zu den Langerhanszellen zu imitieren und für die transkutane Vakzinierung zu nutzen. Wir arbeiten derzeit an der Herstellung von pollenmimetischen Arzneiträgersystemen, die Impfstoffantigene und gegebenenfalls auch Adjuvantien stabil verkapseln, zu den Haarfollikeln dirigieren und am



Die Forschungsgruppe der Abteilung von Prof. Dr. Claus-Michael Lehr an der Universität Saarbrücken / HIPS Foto: HZI



Die Forschungsgruppe von Prof. Dr. Carlos Guzmán am HZI Foto: HZI



Claus-Michael Lehr studierte Pharmazie an den Universitäten Mainz und Hamburg und verfasste anschließend seine Doktorarbeit in den Niederlanden an der Universität von Leiden. 1991 ging er als Postdoc an die Universität von Südkalifornien in Los Angeles, USA, und kehrte im folgenden Jahr in die Niederlande zurück. Dort arbeitete er am Zentrum für Arzneimittelforschung Leiden/Amsterdam. 1993 wechselte Claus-Michael Lehr als Professor für Pharmazeutische Technologie an die Phillips-Universität Marburg und übernahm 1995 den Lehrstuhl für Biopharmazie und Pharmazeutische Technologie der Universität Saarland in Saarbrücken. Im Jahr 1998 war er an der Gründung des Unternehmens Across Barriers GmbH Saarbrücken beteiligt, ist Mitgründer und seit 2000 auch stellvertretender Direktor des Zentrums für Bioinformatik Saarbrücken. Seine erfolgreiche Forschungsarbeit wurde durch zahlreiche Preise ausgezeichnet, zum Beispiel den Internationalen Preis der Belgischen Gesellschaft für Pharmazeutische Wissenschaften (2009) und den APV Forschungspreis für herausragende Leistungen in Pharmazeutischen Wissenschaften (2006). Im Jahr 2010 wurde Claus-Michael Lehr zum „Fellow“ der *American Association of Pharmaceutical Scientists* (AAPS) gewählt. Diese Auszeichnung wurde bislang erst 5 deutschen Wissenschaftlern zuteil.

Ort des Geschehens freisetzen. So sollen die APZ aktiviert und eine effiziente humorale und zelluläre Immunantwort ausgelöst werden. In ersten Experimenten konnten wir bereits zeigen, dass Modellantigene in PLGA-Partikel verkapselt werden können. In gefriergetrockneter Form sind diese Partikel so stabil, dass sie auch gelagert werden können. Sie lassen sich in Wasser redispersieren und können mittels *in vitro*- oder *in vivo*-Assays getestet werden. Die Partikel sollen später in einer kosmetischen Formulierung, wie beispielsweise einem Gel oder einer Lotion, auf die Haut aufgetragen werden, so dass sie einfach herzustellen und für den Patienten akzeptabel und sicher zu verwenden sind.

Seit 2009 leitet Claus-Michael Lehr die Abteilung Wirkstoff-Transport des neu gegründeten Helmholtz-Instituts für Pharmazeutische Forschung Saarland (HIPS) und ist Mitgründer der PharmaBioTec GmbH in Saarbrücken.



Steffi Hansen studierte Pharmazie an der Ernst-Moritz-Arndt Universität in Greifswald und schloss das Studium dort 2004 mit dem Diplom ab. 2004 erlangte sie außerdem die Approbation als Apothekerin. Von 2005 bis 2009 fertigte sie an der Universität des Saarlandes unter der Anleitung von Prof. Claus-Michael Lehr ihre Doktorarbeit mit dem Titel „Development of a physiology based diffusion model to predict dermal absorption using experimental input parameters“ an. Im Anschluss daran ging Steffi Hansen gefördert durch den Deutschen Akademischen Austausch Dienst (DAAD) als postdoc an die University of Cincinnati, USA. Von dort kehrte sie 2010 als Projektleiterin im Bereich Transdermaler Wirkstofftransport an das neu gegründete Helmholtz-Institut für Pharmazeutische Forschung Saarland (HIPS) zurück und arbeitet dort nun an der Entwicklung von neuen Methoden zur transdermalen Vakzinierung.



Carlos A. Guzmán geboren 1959, leitet die Abteilung Vakzinologie und Angewandte Mikrobiologie am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig (Deutschland) und ist apl. Professor an der Medizinischen Hochschule Hannover. Außerdem ist er externer Dozent für die Promovierenden in Biotechnologie an der Universität von Catania (Italien). Carlos Guzmán studierte Medizin an

der Nationalen Universität Rosario (1981) und erhielt 1986 seinen Facharzt in medizinischer Bakteriologie in Argentinien. Als Forschungsstipendiat des italienischen Ausländerministeriums wechselte er 1987 zum Institut für Mikrobiologie der Universität von Genua. In Italien promovierte er zum Doktor der Medizin und Chirurgie und erhielt seinen Doktor in Mikrobiologischen Wissenschaften. 1994 zog er nach Deutschland, wo er die Leitung der Forschungsgruppe Vakzinologie am deutschen Forschungszentrum für Biotechnologie übernahm. 2005 wurde er zum Leiter der neuen Abteilung Vakzinologie am HZI. Auf dem Gebiet der Vakzinologie arbeitet er seit 1989. Seine Arbeit trug maßgeblich zur Entwicklung neuer Adjuvantien und zur Etablierung von *Salmonella* spp. als Trägersystem für DNA-Impfstoffe und therapeutische Moleküle bei.



Ulrich Schäfer studierte von 1971 bis 1974 an der Christian-Albrechts-Universität in Kiel Pharmazie und erwarb dort seine Approbation 1974. 1980 promovierte er an der Universität des Saarlandes bei Professor Dr. H. Loth über das Auflösungsverhalten schwer löslicher Arzneistoffe. Die Anerkennung als Fachapotheker für Pharmazeutische Technologie erhielt er 1994. Seit 1983 ist Ulrich Schäfer selbständig in die Lehre des Faches Biopharmazie und Pharmazeutische Technologie an der Universität des Saarlandes tätig. Im Dezember 2010 wurde er von der Universität des Saarlandes zum apl. Professor ernannt. Als Mitglied gehört er den folgenden Fachgesellschaften an: DPhG, APV, GD, AAPS, CRS und EUSAAT. Sein wissenschaftliches Interesse gilt der Anwendung und Optimierung halbfester dermaler Arzneiformen und transdermaler Systeme, der Entwicklung von *ex-vivo*-Modellen, um die Hautpermeation und Hautpenetration zu untersuchen und *in-silico*-Modellierung der Hautabsorption. Des Weiteren beschäftigt er sich mit Drug-Targeting im Gastro-Intestinal-Trakt und der Lunge unter Einsatz von Nanopartikeln als Plattform.

Literatur

1. Martin Mdel, P., Seth, S., Koutsonanos, D. G., Jacob, J., Compans, R. W., & Skountzou, I. (2010) Adjuvanted influenza vaccine administered intradermally elicits robust long-term immune responses that confer protection from lethal challenge. *PLoS ONE* **5**(5), e10897.
2. Babiuk, S., Baca-Estrada, M., Babiuk, L. A., Ewen, C., & Foldvari, M. (2000) Cutaneous vaccination: the skin as an immunologically active tissue and the challenge of antigen delivery. *Journal of Controlled Release* **66**(2-3), 199-214.
3. Hansen, S., Henning, A., Naegel, A., Heisig, M., Wittum, G., Neumann, D., Kostka, K. H., Zbytovska, J., Lehr, C. M., & Schaefer, U. F. (2008) In-silico model of skin penetration based on experimentally determined input parameters. Part I: Experimental determination of partition and diffusion coefficients. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **68**(2), 352-367.
4. Mitragotri, S. (2003) Modeling skin permeability to hydrophilic and hydrophobic solutes based on four permeation pathways. *Journal of Controlled Release* **86**, 69-92.
5. Glenn, G. M., Rao, M., Matyas, G. R., & Alving, C. R. (1998) Skin immunization made possible by cholera toxin. *Nature* **391**(6670), 851.
6. Koutsonanos, D. G., Martin, M. d. P., Zarnitsyn, V. G., Sullivan, S. P., Compans, R. W., Prausnitz, M. R., & Skountzou, I. (2009) Transdermal influenza immunization with vaccine-coated microneedle arrays. *PLoS ONE* **4**(3).
7. Arora, A., Prausnitz, M. R., & Mitragotri, S. (2008) Micro-scale devices for transdermal drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* **364**(2), 227-236.
8. Combadière, B., & Mahé, B. (2008) Particle-based vaccines for transcutaneous vaccination. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* **31**(2-3), 293-315.
9. Vogt, A., Mahé, B., Costagliola, D., Bonduelle, O., Hadam, S., Schaefer, G., Schaefer, H., Katlama, C., Sterry, W., Autran, B., Blume-Peytavi, U., & Combadiere, B. (2008) Transcutaneous anti-influenza vaccination promotes both CD4 and CD8 T cell immune responses in humans. *Journal of Immunology* **180**(3), 1482-1489.
10. O'Hagan, D. T., Singh, M., & Ulmer, J. B. (2004) Micro-particles for the delivery of DNA vaccines. *Immunological Reviews* **199**, 191-200.
11. Foged, C., Brodin, B., Frokjaer, S., & Sundblad, A. (2005) Particle size and surface charge affect particle uptake by human dendritic cells in an *in vitro* model. *International Journal of Pharmacy* **298**(2), 315-322.
12. Fifis, T., Gamvrellis, A., Crimeen-Irwin, B., Pietersz, G. A., Li, J., Mottram, P. L., McKenzie, I. F., & Plebanski, M. (2004) Size-dependent immunogenicity: therapeutic and protective properties of nano-vaccines against tumors. *Journal of Immunology* **173**(5), 3148-3154.
13. Lademann, J., Richter, H., Teichmann, A., Otberg, N., Blume-Peytavi, U., Luengo, J., Weiß, B., Schaefer, U. F., Lehr, C.-M., Wepf, R., & Sterry, W. (2007) Nanoparticles - An efficient carrier for drug delivery into the hair follicles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **66**(2), 159-164.
14. Luengo, J., Weiss, B., Schneider, M., Ehlers, A., Stracke, F., König, K., Kostka, K.-H., Lehr, C.-M., & Schaefer, U. F. (2006) Influence of nanoencapsulation on human skin transport of flufenamic acid. *Skin Pharmacology and Physiology* **19**(4), 190-197.
15. Stracke, F., Weiss, B., Lehr, C.-M., König, K., Schaefer, U. F., & Schneider, M. (2006) Multiphoton microscopy for the investigation of dermal penetration of nanoparticle-borne drugs. *Journal of Investigative Dermatology* **126**(10), 2224-2233.
16. Lademann, J., Richter, H., Schaefer, U. F., Blume-Peytavi, U., Teichmann, A., Otberg, N., & Sterry, W. (2006) Hair follicles - A long-term reservoir for drug delivery. *Skin Pharmacology and Physiology* **19**(4), 232-236.



Mykobakterielle Phagosomen und angeborene Immunität

AUTOR | Dr. Maximiliano G. Gutierrez | **Nachwuchsforschergruppe Phagosomen Biologie** | mgg08@helmholtz-hzi.de

Obwohl potentielle Pathogene überall und ständig präsent sind, lösen sie nur selten eine Krankheit aus. Die meisten Pathogene werden durch die in unserem Körper stattfindenden angeborenen Abwehrmechanismen sofort eliminiert.

Im Jahre 1882 führte Ilya Metchnikoff ein aufschlussreiches Experiment durch. Er implantierte einer durchsichtigen Seesternlarve einen Splitter und beobachtete, wie Phagozyten diesen Splitter umschlossen und mit rasanter Geschwindigkeit zu vertilgen versuchten. Damals postulierte er, dass Phagozyten ein wichtiger Bestandteil des Immunabwehrmechanismus im Wirtsorganismus sind. Er stellte die Theorie der Phagozytose und der entwicklungsgeschichtlichen Bedeutung der Nahrungsaufnahme zwecks Ernährung und Aufbau von Abwehrmechanismen auf. In Anerkennung seiner Leistungen im Bereich Immunologie erhielt er 1908 zusammen mit Paul Ehrlich den Nobelpreis für Physiologie und Medizin. Mit seiner Theorie schuf Metchnikoff die Grundlage unseres heutigen Wissens über die Phagozytose und die Reaktionen des angeborenen Immunsystems (Bericht in Tauber, 2003).

Phagozytose Die Phagozytose bezeichnet den Vorgang, bei dem spezialisierte und nicht spezialisierte Phagozyten sowie andere Arten von Zellen Partikel vertilgen, die größer als 1 µm sind. Die daraus entstehenden intrazellulären Vakuolen, die als Phagosomen bezeichnet werden, durchlaufen dynamische Veränderungen. In deren Verlauf ändern sich sowohl die Zusammensetzung der abgrenzenden Membranen als auch deren Inhaltsstoffe. Dahinter steht eine Abfolge von Vorgängen, die den Ausbreitungsmechanismen des endozytischen Signalwegs ähnelt. Dieser Vorgang wird als Phagosomreifung bezeichnet. Dadurch wird die Vakuole mit abbaufördernden Eigenschaften ausgestattet, die für ihre mikrobizide Funktion von zentraler Bedeutung sind. Bei den Wirbeltieren bildet sie die vorderste Verteidigungslinie bei der Abwehr von Infektionen (Haas, 2007).

Phagosomenreifung und Immunität Durch den Einsatz von Latexkügelchen konnten bei der Erforschung der Phagosomen-Biologie große Fortschritte erzielt werden. Dieses Modell wurde in den 60iger Jahren zum ersten Mal von Weisman und Korn eingeführt und zu Beginn der 90iger Jahre wiederentdeckt (Desjardins et al., 1994). Der Einsatz von Latexkügelchen bietet für *in vitro* und *in vivo* Analysen vieler phagosomaler Funktionen vielfältige Möglichkeiten. Damit lässt sich der hoch komplexe Prozess der Phagozytose (Abbildung 1) einfach und verständlich abbilden. Da das Latex im Saccharosegradienten flottiert, lassen sich Latexkugelphagosomen wesentlich einfacher in reinen Fraktionen zur Analyse der Inhaltsstoffe isolieren (Abbildung 2). Vieles, was wir heute über Phagozytose und die Phagosomen-Biologie bei Zellsystemen wissen, haben eine große Anzahl von Forschergruppen unter Verwendung des Latexkugel-Phagosomsystems erforscht (Desjardins & Griffiths, 2003). Desweiteren lassen sich diese Kügelchen zur Erforschung der während der Internalisierung stattfindenden Prozesse mit verschiedenen Proteinen bzw. spezifischen Liganden beschichten, die an den Zellrezeptoren selektiv binden. Vor kurzem konnte nachgewiesen werden,

dass sich auch bestimmte Substrate an die Kügelchen koppeln lassen, so dass die enzymatische Aktivität in Echtzeit überwacht werden kann (Yates et al., 2005).

Bei der Aufnahme mikrobieller Pathogene bilden die Phagozyten zwei wesentliche Immunfunktionen aus, die von den Phagosomen kontrolliert werden. Zunächst leiten die Phagosomen teilweise die mikrobielle Elimination ein, indem die aufgenommenen mikrobiellen Pathogene durch einen speziellen Vorgang, der als Phagosom-Reifungssignalweg bekannt ist, zu den Lysosomen geleitet werden. Danach werden das umwandelte Protein und die Lipid-Antigene durch die Phagozyten über den phagozytischen Signalweg in den Haupthistokompatibilitätskomplex (HLA) der Klasse I, den

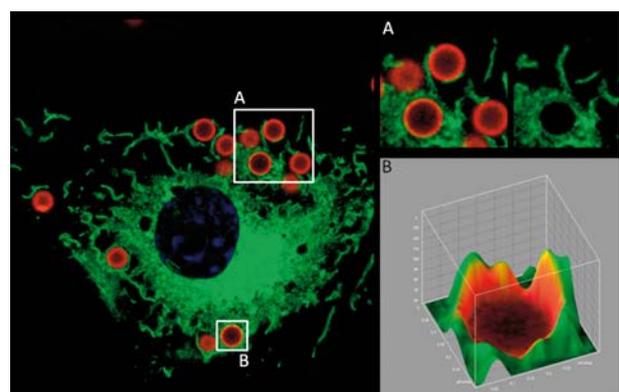


Abb. 1. Phagozytose der Latexkügelchen. RAW 264.7-Makrophagen, die Rab34-GFP (grün) exprimieren, das die IgG-beschichteten Latexkügelchen (rot) mit rasanter Geschwindigkeit vertilgen. Der Zellkern ist blau dargestellt. Dieser Vorgang zeigt eine schematische Darstellung der IgG-opsonierten Bakterien, die auch über die Fcγ-Rezeptoren in die Makrophagen eindringen (FcγRs). A. Kügelchen in verschiedenen Eindringphasen. B. 3D-Darstellung der Lokalisierung von Rab34 auf der Phagosommembran. Foto: HZI, Kasmajour

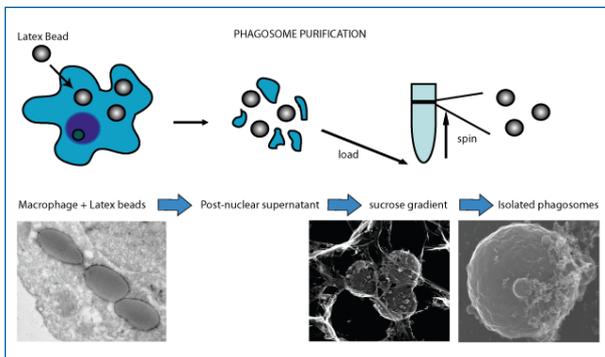


Abb. 2. Reinigung der Phagosomlatexkugeln. Das Schema zeigt die Reinigung der Phagosomlatexkugeln von den Makrophagen für die biochemische und proteomische Analyse. Die Latexkugeln werden unter Nutzung ihrer Eigenschaft, im Saccharosegradienten zu flottieren, internalisiert und dann isoliert. Die Aufnahmen mit dem Elektronenmikroskop zeigen die einzelnen Schritte des Reinigungsprozesses. Die isolierten LBP werden für verschiedene biochemische Assays und proteomische Untersuchungen verwendet. Foto & Grafik: HZI

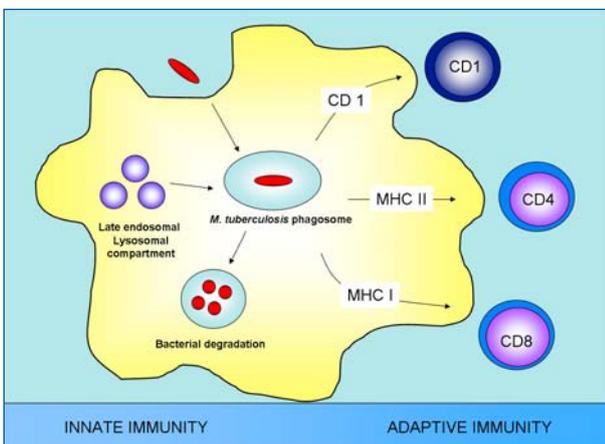


Abb. 3. Der Zusammenhang zwischen Phagosomen und der angeborenen und adaptiven Immunreaktion. Das Phagosom von *M. tuberculosis* hat zwei Aufgaben. Die erste Aufgabe besteht in der kontinuierlichen Aneignung bakterizider Eigenschaften. Dieser wichtige Schritt bei der Ausprägung der angeborenen Immunreaktion erfolgt im Wesentlichen durch die Interaktion der Phagosomen mit den späten Endosomen und Lysosomen (links). Andererseits werden Bakterien im Phagosom abgebaut, wobei Lipide und Peptide in Verbindung mit den HLA Klasse I, Klasse II und den CD1-Molekülen dargestellt werden. Dadurch werden verschiedene Populationen von Lymphozyten aktiviert, die an der Ausprägung der adaptiven Immunität beteiligt sind. Einige dieser Signalwege werden tatsächlich auf verschiedenen Ebenen durch *M. tuberculosis* beeinträchtigt, sind hier aber der Übersichtlichkeit halber nicht mit dargestellt.

HLA der Klasse II und die CD1 positiven Kompartimente geleitet. Durch das Einbringen von Antigenen in die Plasmamembran lassen sich spezifischere, adaptive Immunantworten erzielen. Somit haben die Phagosomen eine Doppelfunktion: sie fungieren als angeborener Immuneffektor und als Brücke zwischen dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem (Abbildung 3). Die Phagosomenreifung ermöglicht somit die Bildung von Zellkompartimenten, in denen die Antigene nach einem exakten Plan abgetötet, abgebaut und verarbeitet werden (Jutras & Desjardins, 2005). Die Erforschung der Phagosomen-Biologie entwickelt sich in rasantem Tempo, was anhand der Fortschritte in einer ganzen Reihe von Disziplinen deutlich wird. Das betrifft auch die Zellbiologie, die Proteomik und die Immunologie. Durch ein besseres Verständnis der Mechanismen, die der Phagosombildung und Phagosomenreifung zugrunde liegen, sowie deren Interaktionen mit intrazellulären Kompartimenten, bietet sich die Möglichkeit, neue Strategien in Hinblick auf eine Modulation der angeborenen und adaptiven Immunantwort zu entwickeln.

Mykobakterielles Phagosom: das außer Kraft gesetzte Kompartiment

Über 1,5 Millionen Menschen sterben jährlich an Tuberkulose (WHO, TB-Bericht von 2008). Dabei verlagern sich multi- und extrem arzneimittelresistente Bakterienstämme aus Osteuropa immer mehr in die westeuropäischen Länder (www.eurotb.org). Obwohl 3,2 Milliarden Menschen mit dem *Mycobacterium tuberculosis* infiziert sind, kann diese Krankheit nur bei 10% der Menschen ausbrechen. Bei den restlichen 90% kommt sie nicht zum Ausbruch, da angeborene und erworbene Immunreaktionsprozesse des Körpers dafür sorgen, dass sich die Vermehrung der Bakterien in Grenzen hält (Korbel et al., 2008). Dies zeigt, dass das angeborene Immunsystem in den meisten Fällen in der Lage ist, die Infektion mit *M. tuberculosis* erfolgreich abzuwehren. Ziel unserer Forschung ist es, diejenigen Wirtsfaktoren zu ermitteln, die diesen Prozess unterstützen. Die genauen Vorgänge, die die anfängliche Keimtötungsreaktion steuern, sind noch nicht in vollem Umfang bekannt. Daher ist zu untersuchen, auf welche Weise Wirtszellen Mykobakterien eliminieren, um neue Therapien entwickeln zu können, mit denen dieser natürliche Prozess verstärkt werden kann.

Um in eukaryotischen Zellen überleben zu können, hat das *Mycobacterium tuberculosis* im Verlaufe der Evolution ein ganzes Repertoire an Mechanismen zur Unterdrückung der Phagosomenreifung entwickelt. Viele klinische Erscheinungen und Probleme, die während einer Tuberkulosebehandlung auftreten, sind eine direkte Folge der Besiedlung mit intrazellulären Bazillen (Russell, 2001). Der entscheidende Vorgang bei einer Infektion mit *M. tuberculosis* besteht darin, dass dieses Pathogen in den sich in den Wirtszellen

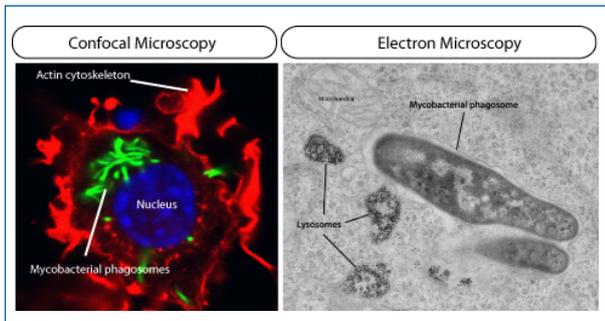


Abb. 4. Visualisierung der mykobakteriellen Phagosomen in Makrophagen. Mit Mykobakterien infizierte RAW264.7-Makrophagen. Die Zellen wurden unter Verwendung der konfokalen Mikroskopie bildlich dargestellt (Grün: Mykobakterien; Blau: Zellkern; Rot: Aktinzytoskelett). Dieselben infizierten Makrophagen lassen sich auch mit dem Elektronenmikroskop beobachten. Hier sind die Lysosomen mit BSA-Gold besetzt. Wie man sieht, verschmelzen die Lysosomen nicht mit den Phagosomen, die die Mykobakterien enthalten. Foto: HZI, Gutierrez

befindenden Phagosomen überleben kann (Abbildung 4). Hinzu kommt, dass ein lebendes Pathogen in der Lage ist, die Phagosomreifung zu manipulieren. Die Strategie, mit deren Hilfe *M. tuberculosis* die Mechanismen des Stoffaustauschs in der Zelle manipuliert, hängt höchstwahrscheinlich von mehreren Faktoren ab und ist sehr komplex. Trotz der vielen Fortschritte, die in den letzten Jahren auf diesem Gebiet erzielt wurden, ist ein mechanistisches Verständnis der Art und Weise, wie sich die Infektion mit *M. tuberculosis* auf Zellebene ausbreitet und wie der Wirt dieses Pathogen in der Anfangsphase abwehrt, immer noch nicht möglich.

Unsere Forschung konzentriert sich dabei auf die Mechanismen, mit deren Hilfe *M. tuberculosis* die Reifung der Phagosomen blockiert und die Vernichtung durch Makrophagen verhindert. Dazu untersuchen wir den intrazellulären Transport von pathogenen und nicht pathogenen Mykobakterien in den Makrophagen. Es ist uns gelungen, neue Faktoren zu ermitteln, die am Stofftransport und der Proteinverteilung in den Vesikeln beteiligt sind, insbesondere an der bei einer mykobakteriellen Infektion stattfindenden Phago-Lysosomfusion. Diese Proteine sind höchstwahrscheinlich an der lysosomvermittelten Abtötung von Mykobakterien sowie an den molekularen Vorgängen beteiligt, die bei der Kopplung zwischen angeborenen und adaptiven Immunantworten eine Rolle spielen (Gutierrez et al., 2009; Gutierrez et al., 2008).

Die vielversprechendsten Proteine sind die Rab-Proteine und die lysosomalen Rezeptoren. Erstere fungieren als molekulare Schalter, die für die Regulierung des Stofftransports durch die Membran und die räumlich-zeitliche Steuerung des vesikulären Stofftransports zuständig sind (Stenmark, 2009). Die lysosomalen Rezeptoren sind für einige wichtige lysosomale Komponenten und Enzyme von Bedeutung, deren Aufgabe der Abbau der Pathogene ist.

Rab-Proteine und Phagosomen Rab-Proteine sind Proteine, die eine entscheidende Rolle bei der Strukturierung der Membrankompartimente spielen und den Transport und den vesikulären Stoffaustausch regulieren. Ein komplexes Netzwerk von Rab-GTPasen ist für die Kontrolle der dynamischen Änderungen bei der Phagosomenreifung zuständig. Wir haben einige Rabs identifizieren können, die höchstwahrscheinlich bei der Reaktion auf mykobakterielle Infektionen, die zuvor nicht mit Infektionen mit intrazellulären Pathogenen in Verbindung gebracht wurden, eine Rolle spielen (Gutierrez et al., 2008). Bei vielen dieser Proteine ist jedoch nicht bekannt, welche Aufgabe sie genau bei der Phagosomreifung spielen. Zur Zeit arbeiten wir daran, die Funktionen dieser Proteine bei der Phagozytose zu bestimmen, sowie deren Auswirkung auf die angeborene Immunantwort auf Mykobakterieninfektionen zu analysieren.

Lysosomale Proteinrezeptoren und Phagosomen Für eines der ermittelten Proteine, das Sortilin, konnte die Funktion bei der Phagosomreifung bestimmt werden. Bis heute besteht die Vermutung, dass ein direkter Transportweg für einige lysosomale Enzyme vom Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) zu den Phagosomen möglich ist. Dabei ist aber noch nicht bekannt, welche Übertragungswege an diesem Vorgang beteiligt sind und welche Enzyme dabei transportiert werden. Unsere Erkenntnisse über Sortilin in Makrophagen zeigen, dass dieses Protein eine bisher noch nicht bekannte und wichtige Funktion beim Transport einer Unterklasse von lysosomalen Proteinen vom Golgi-Bereich zu den Phagosomen hat (Wahe et al., 2010). Somit ergibt sich aus diesen Beobachtungen die Frage, wie die Regulierung der Sortilin-Signalwegfunktionen in Verbindung mit den Phagosomen vonstatten geht, die intrazelluläre Pathogene enthalten.

Ausblick Obwohl *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen Aufschluss über einige Aspekte der Tuberkulose-Pathogenese gegeben haben, ist immer noch nicht vollständig geklärt, wie *M. tuberculosis* in eukaryotischen Zellen überleben kann und warum Wirtszellen unter bestimmten Umständen in der Lage sind, dieses Pathogen zu vernichten. Daher ist ein tiefgreifendes Verständnis der grundlegenden biologischen Vorgänge beim *M. tuberculosis* – das seine Über-

lebensstrategie auf den intrazellulären Bereich ausgelegt hat – für die Entwicklung neuer Therapien zur Bekämpfung der Tuberkulose von größter Bedeutung.

Die Erforschung der Zellbiologie und der zellulären Immunreaktion der Makrophagen auf Mykobakterien ist ein sehr produktives Forschungsgebiet. Das Verständnis dieser Zusammenhänge ist eine Voraussetzung für das Verständnis der mykobakteriellen Pathogenese. Diese Untersuchungen werden zur Lösung zentraler Fragen bezüglich der Reaktion des Wirts auf das Pathogen beitragen und auch neue Erkenntnisse über die grundlegenden Eigenschaften von Zellfunktionen und Funktionen des angeborenen Immunsystems liefern. Es ist zu erwarten, dass die Untersuchungen dazu beitragen, dass man künftig besser verstehen wird, wie die Makrophagen Mykobakterien und andere infektiöse intrazelluläre Pathogene vernichten.



Maximiliano Gabriel Gutierrez wurde 1976 in Mendoza, Argentinien, geboren. Er ist Leiter der Nachwuchsforschergruppe Phagosomen Biologie am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig. Sein Studium absolvierte er an der Universität von San Luis in Argentinien und erhielt dort 2001 seinen Hochschulabschluss in Biochemie und Molekularbiologie. Im Jahre 2005 promovierte er an der Universität von San Luis in Argentinien. Während seiner Promotionszeit verbrachte er einige Zeit als Gastwissenschaftler in den USA und in Deutschland. Danach arbeitete er fast drei Jahre lang als promovierter Wissenschaftler am EMBL in Heidelberg, Deutschland, als Stipendiat der Humboldt-Stiftung und des EMBO. Seit November 2008 ist er Leiter der Nachwuchsforschergruppe Phagosomen Biologie. Das Hauptforschungsgebiet seiner Fachgruppe ist die Untersuchung der Zellbiologie hinsichtlich der Interaktionen zwischen Wirt und Pathogen mit besonderer Berücksichtigung der Mykobakterien.

Literatur

- Desjardins, M., Celis, J. E., van Meer, G., Dieplinger, H., Jahraus, A., Griffiths, G., & Huber, L. A. (1994) Molecular characterization of phagosomes. *The Journal of Biological Chemistry* **269**, 32194-32200.
- Desjardins, M., & Griffiths, G. (2003) Phagocytosis: latex leads the way. *Current Opinion in Cell Biology* **15**, 498-503.
- Gutierrez, M. G., Gonzalez, A. P., Anes, E., & Griffiths, G. (2009) Role of lipids in killing mycobacteria by macrophages: evidence for NF-kappaB-dependent and -independent killing induced by different lipids. *Cellular Microbiology* **11**, 406-420.
- Gutierrez, M. G., Mishra, B. B., Jordao, L., Elliott, E., Anes, E., & Griffiths, G. (2008) NF-kappaB activation controls phagolysosome fusion-mediated killing of mycobacteria by macrophages. *Journal of Immunology* **181**, 2651-2663.
- Haas, A. (2007) The phagosome: compartment with a license to kill. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* **8**, 311-330.
- Jutras, I., & Desjardins, M. (2005) Phagocytosis: at the crossroads of innate and adaptive immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **21**, 511-527.
- Korbel, D. S., Schneider, B. E., & Schaible, U. E. (2008) Innate immunity in tuberculosis: myths and truth. *Microbes and Infection / Institut Pasteur* **10**, 995-1004.
- Russell, D. G. (2001) Mycobacterium tuberculosis: here today, and here tomorrow. *Nature Reviews* **2**, 569-577.
- Stenmark, H. (2009) Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nature Reviews* **10**, 513-525.
- Tauber, A. I. (2003) Metchnikoff and the phagocytosis theory. *Nature Reviews* **4**, 897-901.
- Wähe, A., Kasmapour, B., Schmaderer, C., Liebl, D., Sandhoff, K., Nykjaer, A., Griffiths, G., & Gutierrez, M. G. (2010) Golgi-to-phagosome transport of acid sphingomyelinase and prosaposin is mediated by sortilin. *Journal of Cell Science* **123**, 2502-2511.
- Yates, R. M., Hermetter, A., & Russell, D. G. (2005) The kinetics of phagosome maturation as a function of phagosome/lysosome fusion and acquisition of hydrolytic activity. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* **6**, 413-420.

FOKUS

BERICHTE AUS DER FORSCHUNG

SONDERBEITRÄGE



Fotos von links nach rechts: Während der offiziellen Verabschiedung von Dr. Helmut Blöcker. Dr. Sigggi Weiss gibt Rückblicke zur Arbeit von Helmut Blöcker an der GBF/am HZI | Dr. Kathrin Dinkla, Prof. Dr. G. Singh Chhatwal, Katja Mummenbrauer, PD Dr. Manfred Rohde, Dr. Susanne Talay (von links nach rechts) während einer Diskussion über Streptokokken | Prof. Dr. Christiane Ritter während der Vorbereitung für eine neue Messung am NMR Fotos: HZI, Dornbach (li) | HZI, Ammerpohl (mi) | HZI, Gramann (re)



- 48 Was wären wir ohne DNA-Sequenzen?**

- 52 Magnetische Kernresonanzspektroskopie, ein wichtiges Instrument im Arsenal der Technologieplattform des HZI**

- 60 Internationale Kooperationen am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung mit Indien und China: eine Erfolgsgeschichte**



Was wären wir ohne DNA-Sequenzen?

AUTOR | Dr. Helmut Blöcker | Abteilung für Genomanalyse | hbl@helmholtz-hzi.de

Drei Wochen harte Arbeit im Radioaktivlabor, in der Dunkelkammer, an der Laborbank und Ungeduld beim Pausenbrot. Dann war es geschafft. Gerade als die Kollegen aus der Mensa kamen, konnte ich noch unter fließendem Wasser den frisch entwickelten, entscheidenden Röntgenfilm anschauen. Gemeinsam konnten wir tatsächlich eine Sequenz von 33 Nucleotiden lesen. Ein ganzes Team von Diplomanden, Doktoranden und Postdocs hatte Anfang der Siebziger Jahre zusammen daran gearbeitet, das weltweit erste für ein Polypeptid kodierende Strukturgen chemisch-enzymatisch herzustellen. Rund drei Jahre Arbeit des Teams, und ich hielt damals den ersten mühevoll erzeugten Beweis für die Existenz der Zielverbindung in Händen: 33 Banden auf einem Röntgenfilm.

Wie kann es sein, dass man heute ganze menschliche Genome mit Milliarden DNA-Bausteinen sequenziert, während damals – innerhalb ein und desselben Forscherlebens – das Glück in einer Kurzsequenz von 33 Nucleotiden lag?

Die Entwicklung der Sequenzieretechnik (1) Während meiner Promotionsarbeit, also in den Jahren noch vor dem 33-Basen-Erfolg, war das Sequenziererezept der Wahl die „wandering-spot-Methode“. Maximale Leseweite etwa 13 Nucleotide. Gerade mal gut genug, um die chemisch synthetisierten Oligonucleotide für den Aufbau des erwähnten 33er-Doppelstrangs analytisch zu überprüfen. In Deutschland hatte Hans Groß nach einem Arbeitsaufenthalt am MIT die Methode am MPI für Biochemie in Martinsried für RNA-Analytik etabliert. Gemeinsam erprobten wir dort erfolgreich die Anwendung auf DNA-Sequenzen.

Zur Überprüfung längerer Sequenzen kam uns die Entwicklung der basenspezifischen chemischen Spaltung der DNA, die Methode von Maxam und Gilbert, zugute. Aber wie kommt man an die Details der trickreichen und noch nicht veröffentlichten Methode? Ohne die Existenz von Internet und E-Mail, pdf-Anhängen und sogar ohne Fax? Als Antwort auf einen Luftpostbrief von mir an Allan Maxam am MIT kam ca. 6 Wochen später die Erlaubnis, eine Kopie eines noch geheimen Protokolls von Heinz Schaller vom DKFZ anfertigen zu dürfen. Daher also der 33-Basen-Erfolg.

Auch ein Hardcore-Chemiker arbeitet nicht gerne mit giftigen und instabilen Substanzen wie nach Maxam/Gilbert. Es ist also nicht verwunderlich, dass diese Methode bald von der Didesoxymethode nach Sanger („Kettenabbruch-Synthese“) vollständig abgelöst wurde. Bald konnte man Leseweiten von mehreren hundert Nucleotiden erzielen und über Flachgelelektrophoresegeräte viele Proben gemeinsam analysieren. Wir hatten damals rund ein Dutzend solcher Geräte, sodass wir einen Raum extra für die Vor- und Nachbereitung der Elektrophoresekassetten (Gele gießen, Glasplatten säubern etc.) inklusive Spezialspülmaschine eingerichtet hatten.

Diese Fronarbeit hatte ein Ende, als kommerzielle Sequenzierautomaten zur Verfügung standen, in denen die Trennung des Sequenzier-Reaktionsgemisches nicht mehr neben-

einander auf Flachgelen, sondern über mit Trennmateriale gefüllte Kapillaren vorgenommen wurde. Zudem wurden die Kapillaren automatisch aus Mikrotiterplatten mit Proben beladen. Diese Generation von Geräten bildete die Basis für die erste Gesamtsequenz eines menschlichen Genoms, wie sie vom internationalen öffentlichen Humangenomkonsortium unter Beteiligung unserer Abteilung erarbeitet wurde.

Die Sequencer und die Prozeduren um sie herum waren derart ausgefeilt, dass man durchaus Leseweiten von 1300 Nucleotiden pro Trennkapillare bei bis zu 384 Kapillaren in einem Gerät erreichen konnte. Für Ästheten waren die grauen Kästen keine Offenbarung – das hat sich bis heute nicht geändert. Unsere zahlreichen Besucher konnten wir höchstens mit den Anschaffungskosten beeindrucken (mehrere hunderttausend Euro pro Gerät). Kaum einer der Laborkräfte konnte sich damals Anfang dieses Jahrzehnts vorstellen, dass die gesamte Sanger-basierte Technologie in wenigen Jahre hoffnungslos unterlegen und museumsreif sein würde.

Durch Fachkongresse und insbesondere durch internationale Begutachtungsunterlagen konnten Fachleute schon zur Blütezeit der Sanger-Technologie klar erkennen, dass bald eine völlig neue Generation von Geräten und Verfahren auf dem Markt sein würde („next generation sequencing“). Heute werden die drei wesentlichen Varianten von Techniken und Geräten dieser Generation von den Firmen Roche, Life Technologies und Illumina vertrieben. Wir entschieden uns 2007 für die Illumina-Geräte, die heute marktbeherrschend sind. Erstaunlich ist, dass sich die Produktivität unserer Geräte durch umfassende Optimierungen innerhalb von rund zwei Jahren im Sequenz-Ausstoß auf etwa 1500 Prozent verbesserte. Heute kann auf einem einzigen Sequenziergerät die Rohsequenz eines kompletten menschlichen Genoms erstellt werden – zu moderaten Kosten von einigen Tausend Euro. Zur Erinnerung: Die ersten Schätzungen für die Kosten des öffentlichen Humangenomprojektes lagen bei etwa zwei Milliarden US-Dollar!

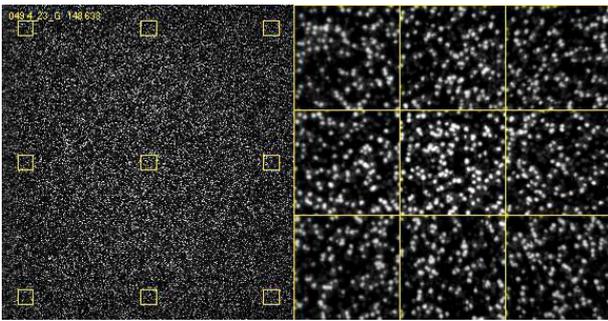


Abb. 1. Automatisierte Cluster-Analyse vom Illumina Sequencer. Innerhalb von etwa 2 Jahren konnte die Sequenzierungsproduktivität um 1500 % durch umfassende Optimierungen gesteigert werden. Rechts: Vergrößerte Darstellung. Foto: HZI

Ein erstaunlicher Weg also von „handgemachten“ 33 Basenpaaren zu den Maschinen der Jetztzeit. Es gehört aber kein Tiefenwissen dazu, um anzunehmen, dass die Entwicklung stürmisch weiterverlaufen wird. Eine grafische Erklärung für Linien der Technologieentwicklung findet sich in Clayton Christensens Buch „The Innovator’s Dilemma“ (2).

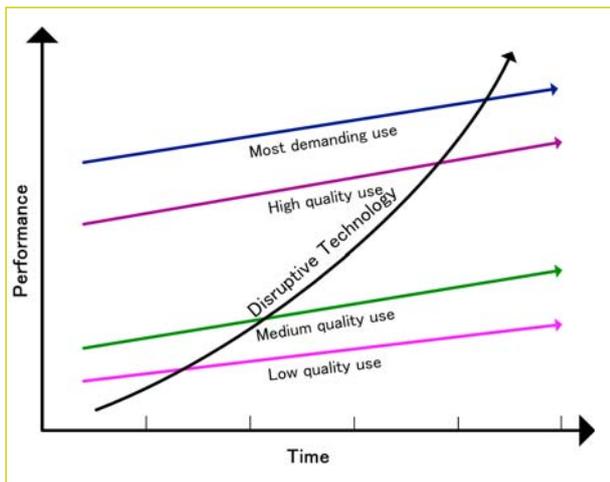


Abb. 2. Clayton Christensen. Wie sich ablösende Technologien aus schwachen Marktsegmenten heraus über die Zeit entwickeln.

In der Tat kündigen sich die ersten Geräte auf dem Markt an, die kleiner, hoch integriert, sehr viel niedriger im Anschaffungspreis sind und mit extrem niedrigen Betriebskosten arbeiten können. Es werden künftig routinemäßig Einzelmoleküle sequenziert werden können. Das DNA-Material wird frei von künstlichen Markierungen eingesetzt, und Leseweiten von mehreren Zehntausend Nucleotiden zeichnen sich ab. Ein Fokus wird hierbei auf Entwicklungen in der Nanotechnik und der Mikrofluidik liegen. Die ersten Sequencer für rund fünfzigtausend Euro sind auf dem Markt. Eine britische Firma kündigte für die nächsten Jahre Einweg-Sequencer in der Größe eines USB-Sticks an. Einfach atemberaubend!

Kein Wunder, dass bei solchen Preisperspektiven die DNA-Sequenzierung sehr bald Eingang in die tägliche Routineanalyse finden wird. In Krankenhäusern, in der Pharmaindustrie, der Nahrungsmittelindustrie, der Züchtungsforschung, in Gesundheits- und Lebensmittelüberwachungsämtern. Sicher bald auch auf Bauernhöfen und in Arztpraxen.

Gegenüber der Zeit vor den jetzigen Geräten ist kaum noch etwas wie es war. Dies betrifft nicht nur die Effizienz, sondern vor allem die erheblich gesteigerte Vielseitigkeit der neuen Geräte und der für sie entwickelten Prozeduren. Es geht nicht mehr bloß um Kontrolle von Klonierungsreaktionen oder *de novo*-Sequenzen von Genomen, sondern zum Beispiel auch um die Analyse von Transkripten, Metagenomen, genomweiten Methylierungsmustern, Genduplikationen, SNPs. Es ist gerade diese methodische Ausweitung der Sequenzieretechnologie, die nicht nur die bisherige Chip-Technologie kannibalisiert und sie zu einer reinen Nischentechnik reduziert, sondern die auf sehr lange Zeit Sequenzierautomaten zu einem unverzichtbaren Bestandteil jedes molekularbiologischen Labors macht. In Zukunft wird ein PS („Personal Sequencer“) im Labor so selbstverständlich sein, wie heute etwa eine PCR-Maschine.

Sicher wäre es eine ungehörige Übertreibung, wenn man behauptete, die jetzigen und kommenden Sequencer könnten von gut trainierten Affen betrieben werden. Aber zumindest die kommenden Geräte werden den technischen Kräften weniger abverlangen und werden trotzdem nahezu unvorstellbare Mengen an Daten produzieren. Wir sollten uns nachdrücklich und sofort auf die Situation einstellen, dass wir intelligente Bioinformatiker und auch Experten mit breitem molekularbiologischem und medizinischem Wissen brauchen, die mit Massendaten umgehen können.

Bei aller Begeisterung für die rasante Entwicklung der reinen Datengenerierung, war dies über lange Zeit schon unsere permanente Mahnung – nicht zuletzt in meinem HZI-internen Papier von 2006 zur Bestandsaufnahme rund um Sequenzierung („Some Remarks Relating to Next Generation Genetic Analyzers“).

Exkurs Förderpolitik International wäre die heutige Genom-basierte Forschung ohne massive öffentliche und private Investitionen schlichtweg nicht existent. Nachdem Mitte der 1980er Jahre unser Interesse an Genomforschung geweckt war, wurde sehr schnell klar, dass es substanzielle Fortschritte nur mit starken Förderungen geben könnte. Mein Papier „Technologieentwicklung und Genomforschung“ wurde zur Basis eines Förderprogramms des deutschen Forschungsministeriums. Es lief über eine Reihe von Jahren und mobilisierte insgesamt rund 150 Millionen DM für die wissenschaftliche Landschaft in Deutschland. Ein Teil der hinter dieser und anschließenden Förderungen stehenden Logik erscheint jedoch heute zumindest als diskutabel. Die Logik lautete etwa so: Erst entwickeln wir Technologie, dann generieren wir Daten, dann interpretieren wir Daten, dann entwickeln wir Ansätze für neue Diagnosen und neue Therapien und schließlich vermarkten wir die Endresultate. Schön gedacht, aber weltfremd. In den meisten Spitzenländern wird bis zum heutigen Tag anders vorgegangen. Bestes Beispiel sind die USA und China. Dort wird durchgehend jedes Glied der Kette von der Technologieentwicklung bis zur medizinischen Anwendung substanziell gefördert. Speziell der Technologiesektor dürfte in den USA Milliardenumsätze erzielt haben. Frühe und richtungsweisende Entwicklungen in Deutschland stießen hierzulande leider nicht auf nachhaltiges Fördererinteresse. In Abwandlung des Titels dieses Aufsatzes darf man fragen: Wo könnten wir in Deutschland mit mehr DNA-Sequenzen sein?!

Vom Nucleinsäurechemiker zum Sequenzierer Nach Abschluss meiner Diplomarbeit an der damaligen GMBF in Braunschweig schloss ich mich in Hamburg einem jungen und dynamischen Team zur Gensynthese an. Es ging hauptsächlich um den erwähnten DNA-Doppelstrang von 33 Basen Länge, der die genetische Information für das Peptidhormon Angiotensin II trägt (3).

Mit den in Hamburg gesammelten Erfahrungen und den erarbeiteten Entwicklungen bauten Ronald Frank und ich gemeinsam ab 1980 eine Arbeitsgruppe an der GBF auf. Innerhalb von drei Jahren hatten wir unser Fünfjahresziel erreicht. Wir synthetisierten Oligonucleotide und produzierten danach chemisch-enzymatisch längere Gene. Fertige

DNA-Doppelstränge weckten unsere Neugier auf optimale Expressionssysteme. Exprimierte synthetische Gene ließen uns von künstlichen Proteinen träumen. Am Lernbeispiel von Proteaseinhibitor- und anderen Genen mussten wir erfahren, dass selbst bei diesen Proteinfamilien zu wenig Information über die Beziehung von gezielten Genvarianten zu biologisch aktiven Proteinen zur Verfügung stand. Es schien uns sinnvoll, in Richtung eines akzeptablen Algorithmus zu arbeiten. Dies konnte nach dem Stand der damaligen Technik nur über massenweise DNA-Sequenzierung, die der direkten Peptidsequenzierung haushoch überlegen war, versucht werden.

Mit dem Kapitel oben zur Entwicklung der Sequenzierertechnik ist klar, dass man nur an der Spitze mitarbeiten konnte, wenn man sich der Herausforderung von technischen Innovationen stellte. Wir versuchten dies durch die Entwicklung der „Shortmer“-Technologie sowie fortlaufende Robotik-, Bioinformatik- und Biochemie-Entwicklungen, die uns wie bei den Arbeiten mit Gerhard Kauer (4) und Igor Deyneko auch heute noch ein Alleinstellungsmerkmal geben. Als Konsequenz wurden die diversen Aktivitäten rund um die Sequenzierung spätestens ab Beginn der neunziger Jahre zu einem Schwerpunkt der späteren Abteilung Genomanalyse der GBF/des HZI. Glücklicherweise hatten wir sehr früh die Chance, uns in internationalen Sequenzierprojekten wie den von der EU geförderten Hefe- und Arabidopsis-Genomprojekten zu bewähren.

Das ultimative Projekt war sicherlich das öffentliche Humangenomprogramm (5), an dem wir als eines von 16 weltweiten Genomzentren teilnahmen. Dieses oft als Mondlandeprojekt der Bioforschung bezeichnete Programm erzielte ein weltweites Echo in den Medien und in der Gesellschaft wie kaum ein anderes aus den biologischen Wissenschaften. Vor ein paar Jahren gab es aus verschiedenen Quellen das Gerücht, unser internationales Konsortium sei für die Verleihung eines Nobelpreises vorgeschlagen. Nun ist erstens ein Gerücht ein Gerücht, und zweitens ist Helmut Kohl gerüchteweise schon einige Male für einen Nobelpreis vorgeschlagen worden, ohne dass er ihn bis heute erhalten hätte. Ich fand die Idee mit dem Nobel-Gerücht interessant. Als ich in den USA zuerst von einem britischen Offiziellen davon erfuhr, war meine Spontanreaktion: „Brilliant! I would love to become 0.2 percent of a Nobel laureate“! Schließlich waren letztlich einige Hundert Wissenschaftler an dem Projekt beteiligt. Allerdings gibt es – anders als etwa für die Physik – für die Biowissenschaften die Regel, dass der Preis ohnehin nur an maximal drei Personen verliehen werden kann.

Man mag Genomforschung mit ihrem Kernelement Sequenzanalyse als Kärnerarbeit für Forschung, Entwicklung und Anwendung in den Biowissenschaften und der Medizin sehen. Aus diesen Bereichen wird sie aber immer weniger wegzudenken sein. Schon im Jahr 2000 trug die Zeitschrift „Science“ die Sequenzierung ganzer Genome in ihre Annalen der interdisziplinären Durchbrüche des Jahres ein (6). Francis Collins, Berater von Präsident Obama, Direktor des NIH und vorher Sprecher unseres Humangenomprogramms hat es kürzlich so ausgedrückt: „Genome research is really just beginning and it can be dizzying to live on an exponential curve“. So war es und so ist es.

Zurück zum Titel Was wären wir ohne DNA-Sequenzen? So frage ich im Titel dieses Aufsatzes. Die aller einfachste Antwort wäre (zutreffend, aber ein Diskussionskiller): Wir, sogar jegliche Lebensformen würden gar nicht existieren ohne DNA-Sequenzen. Aber Forschung und Entwicklung haben es uns an die Hand gegeben, dass wir über die Stoffklasse der Nucleinsäuren abwechslungsreiche Reisen in das Universum unseres Inneren antreten können. Als Fan der Weltraumforschung interessiert mich diese Art von innerem Universum wesentlich stärker als das Universum um unsere Welt herum. Vielleicht egozentrisch gedacht, aber sicher auch näher an Entdeckungen, die uns mehr Wissen über uns selbst geben und – verantwortlich eingesetzt – uns das Leben besser gestalten lassen. Das erhoffe ich mir insgeheim auch für mich selbst. Vor dem Hintergrund tausender menschlicher Genome, die zurzeit weltweit analysiert werden, sollte auch meine eigene Genomsequenz einige interessante Geheimnisse preisgeben. Das erwarte ich auch von den Genomsequenzen meiner drei Braunschweiger Kollegen, die zugleich mit meiner Sequenz in der Analyse sind.

Fundierte Kenntnisse von DNA-Sequenzen sind der Schlüssel dafür, um mehr über uns und unsere Umgebung zu wissen, heute und morgen. Als Nucleinsäure-Mensch, was kann man mehr von seinem Berufsleben erwarten?

Helmut Blöcker, geboren 1945, erwarb sein Diplom in Chemie an der TU Braunschweig 1972. Seine Doktorarbeit (1972-75) führte er an der Universität Hamburg durch, wo er nach der Promotion noch 5 weitere Jahre als Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der gleichen Arbeitsgruppe tätig war. 1980 kam er an die GBF, wo er die Arbeitsgruppe DNA-Synthese aufbaute. Von 1994 -2010 war er Leiter der Abteilung „Genomanalyse“ an der GBF/dem HZI.



Abb. 3. Vier Genome in der Analyse: Michael Jarek, Tschong-Hun Im, Maren Scharfe, Helmut Blöcker, alle neben einer handgearbeiteten DNA (Abschiedsgeschenk an H.B.) Foto: HZI

Literatur

- (1) Weitere Information zur Sequenzierung: http://en.wikipedia.org/wiki/DNA_sequencing#cite_note-6
- (2) Christensen, Clayton M. (1997). The innovator's dilemma: when new technologies cause great firms to fail. *Harvard Business Press*. ISBN 9780875845852.
- (3) Köster, H., Blöcker, H., & Frank R., Geussenhainer S., & Kaiser W. (1975) Total Synthesis of a Structural Gene for the Human Peptide Hormone Angiotensin II. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie* **356** (2), 1585–1594.
- (4) Kauer, G. & Blöcker, H. (2003) Applying signal theory to the analysis of biomolecules. *Bioinformatics* **19**, 2016–2021.
- (5) International Human Genome Sequencing Consortium (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860–921.
- (6) Pennisi, E. (2000) Breakthrough of the year. Genomics Comes of Age. *Science* **290**, 2220–2221.



Magnetische Kernresonanzspektroskopie, ein wichtiges Instrument im Arsenal der Technologieplattform des HZI

AUTOR | Dr. Victor Wray | Forschungsgruppe Biophysikalische Analytik | vwr@helmholtz-hzi.de

Die Analytikplattform ist die älteste zentrale Einrichtung am HZI, die mit modernsten Instrumentarien und den besten Kapazitäten zur strukturellen Untersuchung aller Arten von Biomolekülen ausgestattet ist. Die Plattform stellt detaillierte Strukturdaten in den unterschiedlichsten Formen bereit. Sie sind für das Verständnis der grundlegenden molekularen Mechanismen und der Wechselwirkungen, die die Zellprozesse bei der Wirt-Pathogen-Interaktion steuern, von großer Bedeutung.

Die Plattform stellt umfangreiche Instrumentarien zur Bestimmung der dreidimensionalen Struktur aller Arten von Naturstoffen zur Verfügung und bietet Einsatzmöglichkeiten für nahezu alle Bereiche im Rahmen von HZI-Forschungsprogrammen zum Thema „Infektion und Immunität“.

Jüngste Berichte aus dieser Reihe konzentrieren sich auf den Einsatz der Elektronenmikroskopie und der Röntgen-Kristallographie. Mit der Elektronenmikroskopie können diverse Super-Makromoleküle, Organellen und Bakterien bildlich dargestellt werden. Desweiteren gibt dieses Verfahren Aufschluss über kleinste Details bezüglich der Art und Weise, wie viele Pathogene sich an die Wirtszelle haften und in diese eindringen. Die Röntgenkristallographie, eine Ergänzung zur Elektronenmikroskopie, bietet die Möglichkeit, strukturelle Details von Proteinen und deren Molekülkomplexen in Verbindung mit Liganden und anderen Proteinen auf atomarer Ebene zu untersuchen. Mit dieser Methode konnten viele Informationen darüber gewonnen werden, in welcher Weise die Bakterien an der Wirtszelle anhaften, in diese eindringen und sich vermehren und wie der Rezeptorsignalweg beim Menschen funktioniert. In diesem Beitrag wird der Einsatz der magnetischen Kernresonanzspektroskopie für Untersuchungen von Naturstoffen mit kleinem Molekulargewicht in Lösungen genauer beschrieben. Diese Untersuchungen spielen bei der Erforschung und Entwicklung von neuartigen Antiinfektiva eine wichtige Rolle. Daraus ergeben sich Informationen, die über die mit der Röntgenkristallographie gewonnenen Erkenntnisse hinausgehen.

Einleitung Am Institut wurde bereits in den Anfangsjahren nach der Gründung erkannt, dass zur Erforschung grundlegender natürlicher Prozesse Instrumente erforderlich sind, mit deren Hilfe die biologischen Strukturen untersucht werden können. Durch die rasante Entwicklung auf dem Gebiet der physikalisch-technischen Grundlagenforschung und die Nutzung der Vorteile der Computertechnik konnten in den letzten vier Jahrzehnten enorme Fortschritte verzeichnet werden. Dabei war für die Strukturbiologie die rasante Entwicklung auf dem Gebiet der magnetischen Kernresonanzspektroskopie (NMR), der Massenspektrometrie (MS), der Röntgenkristallographie und der Elektronenmikroskopie (EM) von besonderer Bedeutung. Diese Verfahren bilden zusammen das Kernstück des Instrumentariums am HZI und bieten die Möglichkeit, kleinste Details des gesamten Spektrums biologischer Strukturen zu erforschen: von den kleinsten Mengen natürlich vorkommender Stoffe (NMR und MS) über Makromoleküle und deren Komplexe (Röntgen) bis zu den größten Strukturen, wozu auch Organellen und Bakterien (EM) gehören (Abbildung 1). Im vorangegangenen Bericht 2008/2009 wurde gezeigt, wie sich durch die intelligente Nutzung der Röntgenkristallographie detaillierte Informationen über die Interaktionen zwischen mikrobiellen

Pathogenen und dem Wirtsorganismus auf atomarer Ebene gewinnen lassen. Dank dieser Informationen ist es möglich, neue Strategien und Werkzeuge zu entwickeln, die unsere Erkenntnisse über bakterielle Infektionen erweitern. In diesem Bericht wird auf die verwendete NMR-Spektroskopie als Ergänzungstechnik und deren Einsatz für die Erforschung biologisch aktiver Naturstoffe näher eingegangen.

Der Atomkern als Energiequelle Gegen Ende der vierziger Jahre des 20. Jahrhunderts konnte nachgewiesen werden, dass die Zellkerne bestimmter Atome elektromagnetische Strahlung aus einem Magnetfeld absorbieren können. Dabei hängt die Strahlungsfrequenz von der Stärke des Magnetfeldes, dem beteiligten Atomkern und – was sehr wichtig ist – vor allem von der speziellen chemischen Umgebung des Atoms ab. Von den üblicherweise vorkommenden Atomen, tritt diese Erscheinung nur bei ^1H , ^{13}C , ^{15}N und ^{31}P auf. Daraus ergibt sich ein großes Potenzial für die Erforschung von Strukturen organischer Verbindungen und damit der meisten Naturstoffe. Die Entwicklung energiereicher, stabiler Magnetfelder machte eine hochauflösende Darstellung von Signalen möglich, die von ein und demselben Atomkern stammten, der sich jedoch in unterschiedlichen

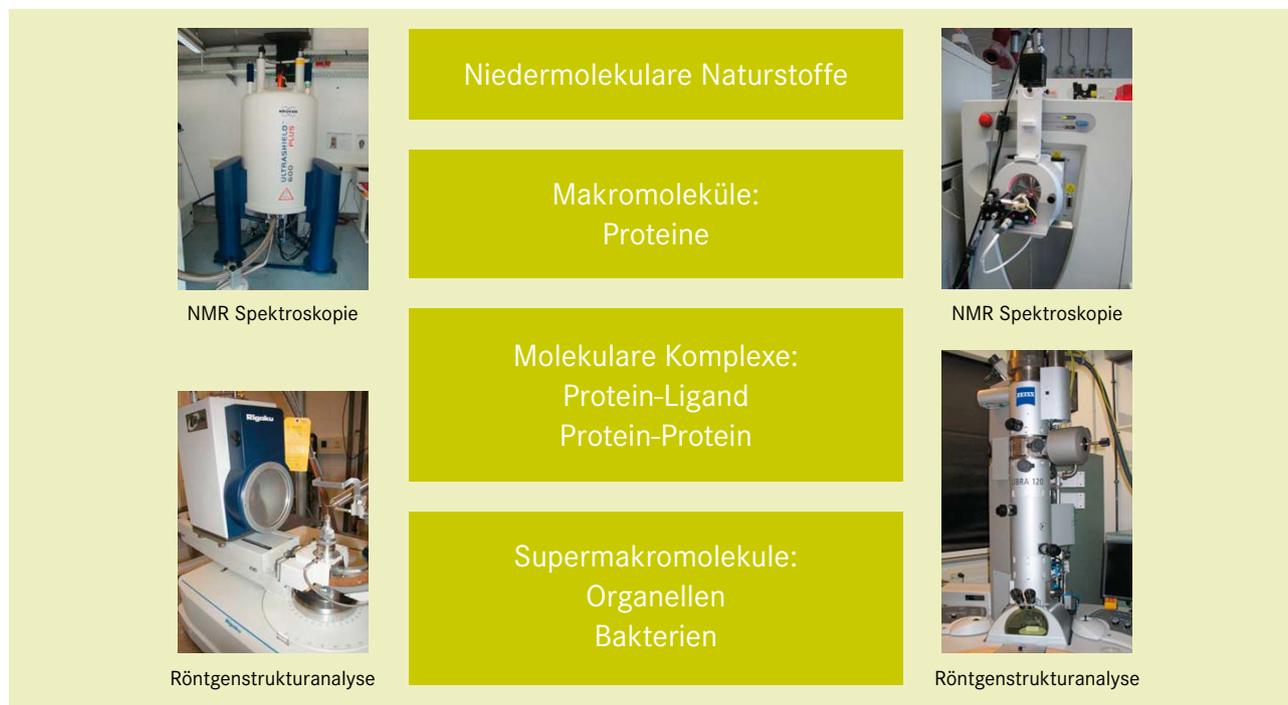


Abb. 1. Analytikplattform Fotos: HZI

chemischen Umgebungen befand. Im Anschluss daran brachte die Einführung der gepulsten NMR-Spektroskopie einen wesentlichen Fortschritt in Verbindung mit der sich rasant entwickelnden Computertechnik. Das brachte eine beträchtliche Erhöhung der Empfindlichkeit der Messmittel mit sich. Die Entwicklung des zweidimensionalen (2D)-NMR-Verfahrens in den siebziger Jahren, insbesondere durch R. R. Ernst (Nobelpreis 1991), leitete den Beginn einer neuen Ära in der NMR-Spektroskopie ein. Durch den Einsatz dieser Techniken war es nun möglich, Bindungsstrukturen in Molekülen entweder über die sogenannten „Through-bond“-Wechselwirkungen gleichartiger Kerne (homonukleare 2D-NMR) bzw. verschiedenartiger Kerne (heteronukleare 2D-NMR) zu bestimmen, oder durch eine Konformations-, Sequenzbildungs- und Faltungsanalyse von Molekülabschnitten durch Beobachtung der „Through-space“-Wechselwirkungen Eigenschaften zu identifizieren.

Seit den frühen siebziger Jahren wurde dieses NMR-Instrumentarium in unserem Institut konsequent auf die technischen Neuerungen ausgerichtet, da dieses Verfahren mittlerweile eine der leistungsfähigsten Techniken für die routinemäßige Erforschung von Strukturen biologisch aktiver, natürlicher Substanzen auf atomarer Ebene ist. Bei pharmakologisch relevanten Substanzen mit einem Molekulargewicht von weniger als 2000 Da bietet die neue Technik gegenüber dem Röntgenverfahren den Vorteil, dass das zu untersuchende Material nicht in Kristallform vorliegen muss und somit auch strukturelle Details sehr schnell ermit-

telt werden können. Auf der Grundlage der langjährigen Erfahrungen wird die NMR-Spektroskopie zur Aufklärung von Strukturen einer sehr großen Anzahl von Naturstoffen verwendet, die von einer Vielzahl von Forschergruppen innerhalb des HZI und von externen Quellen stammen.

Die Suche nach neuartigen Antiinfektiva: Strukturen biologisch aktiver Substanzen Das verstärkte Auftreten neuer wie altbekannter Pathogene stellt auch in den entwickelten Industrieländern eine permanente und ernst zu nehmende Gefahr für die Gesundheit des Menschen dar. Daher ist und bleibt die Erforschung neuartiger Antiinfektiva auf der Basis natürlicher Substanzen sowie deren Bestimmung, Charakterisierung und klinische Entwicklung ein wichtiges Ziel im Rahmen des HZI-Forschungsprogramms „Infektion und Immunität“. Die Untersuchung der Struktur derartiger Verbindungen bildet die Voraussetzung für die Entwicklung neuer Medikamente und kann am einfachsten mit der NMR-Spektroskopie und der Massenspektrometrie erreicht werden.

Im Gegensatz zur chemischen Synthese besteht keinerlei Vorwissen bezüglich der Struktur einer Verbindung, die aus Pflanzen, Bakterien oder Pilzen extrahiert wird und die eine potenzielle Quelle für neue aktive Substanzen darstellt. Daher wird nach der Isolierung des Materials eine geringe Menge in einem organischen Lösungsmittel aufgelöst, wovon dann ein einfaches Protonenspektrum (^1H) aufgezeichnet wird (Abbildung 2). Dieses Spektrum enthält bereits

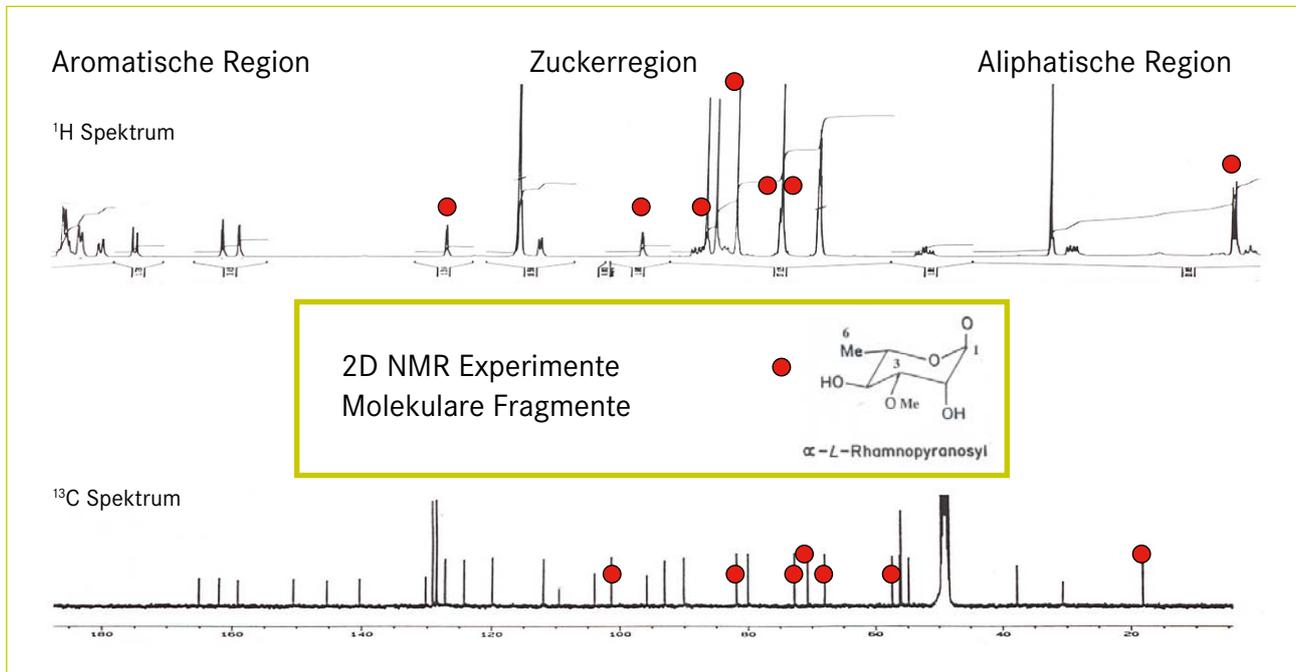


Abb. 2. 1D-NMR-Spektrum einer unbekanntem, in Methanol-d₄ gelösten Verbindung Grafik: HZI

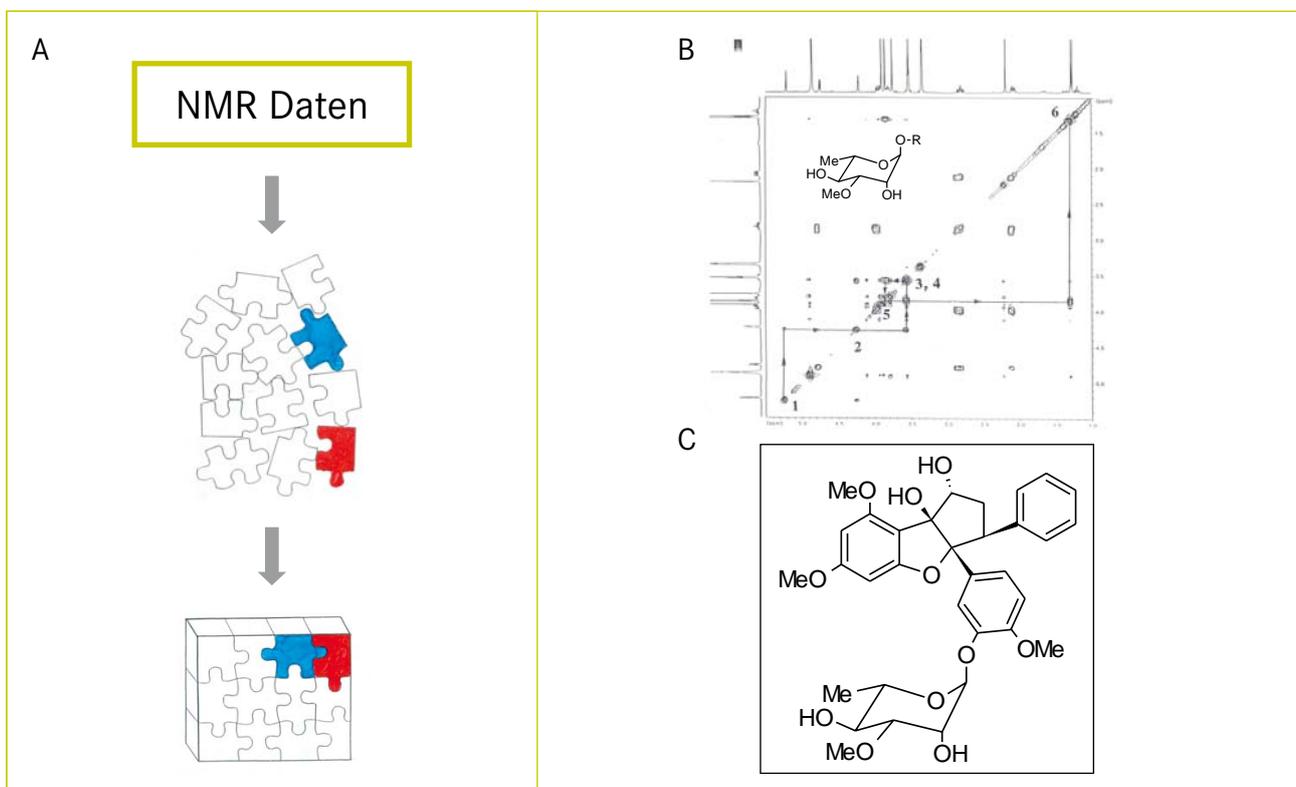


Abb. 3. Analytisches Verfahren (A), 2D ¹H-¹H-Spektrum, das den Zuckerbaustein (B) und die gesamte Struktur (C) zeigt Grafik: HZI

eine große Menge an Informationen über die Beschaffenheit der im Molekül enthaltenen Bestandteile. Anhand der Anordnung der Signale im Spektrum erhält man ein Abbild der örtlichen Verteilung des beobachteten Protons, wodurch eine Unterscheidung zwischen aromatischen Verbindungen, Zuckermolekülen und aliphatischen Gruppen möglich ist. Während das über das Signal berechnete Integral die Anzahl der vorhandenen Protonen angibt, können aus den Splittings detaillierte Informationen über die Anzahl und Anordnung von Protonen in der unmittelbaren Umgebung gezogen werden. Zusätzliche Informationen lassen sich aus dem Kohlenstoffspektrum (^{13}C) gewinnen, das wiederum eine Signalverteilung ergibt, anhand derer sich die Anzahl und Arten der Kohlenstoffatome problemlos ermitteln lassen.

Mit Hilfe der 2D-NMR-Spektroskopie können heute die Fragmente des jeweiligen Moleküls bestimmt werden (Teile des Puzzles, Abbildung 3). Das homonukleare 2D ^1H - ^1H -Spektrum zeigt Signale jenseits der Diagonalen, die den „Through-bond“-Interaktionen zwischen den Wasserstoffatomen entsprechen, die sich im Abstand von zwei bzw. drei Bindungsstellen befinden. Anhand dieser Wechselwirkungen werden ganze Serien dieser Interaktionen zurückverfolgt, durch die die einzelnen Fragmente im Molekül gekennzeichnet sind. Durch weitergehende heteronukleare 2D ^1H - ^{13}C -Spektraluntersuchungen werden die Art der vorhandenen Fragmente bestimmt und die

einzelnen Puzzleteile zusammengesetzt. So entsteht dann ein fertiges dreidimensionales Abbild der Molekülstruktur. Die genauen Angaben zur Konformationsanalyse dieser Struktur erhält man durch die Untersuchung der Größenordnung der Splittings im 1D ^1H -Spektrum und anhand der „Through-space“-Wechselwirkungen zwischen den Protonen in den einzelnen Fragmenten. Schließlich können mit Hilfe der Massenspektrometrie, UV- und IR-Spektroskopie Vergleichsdaten zum Molekulargewicht gewonnen werden.

Diese Methodik wurde in den vergangenen dreißig Jahren zur Klärung der Struktur vieler Naturstoffe intensiv genutzt und wird auch weiterhin das Mittel der Wahl sein. Durch die technische Weiterentwicklung, insbesondere der Empfindlichkeit und des Auflösungsvermögens durch moderne Systeme supraleitender Magneten, ist es heute möglich, kleinste Mengen von Materialien zu untersuchen (0,2 bis 1 mg), ohne dass eine chemische Abwandlung dafür erforderlich ist. Wie aus vorherigen Beispielen hervorgeht, hat die NMR-Strukturuntersuchung eine wesentliche Rolle bei der Erforschung und Bewertung neuer Antiinfektiva gespielt, insbesondere bei der Klärung der Strukturen einer Vielzahl von biologisch aktiven Verbindungen, die von Myxobakterien erzeugt werden. Ein aussagefähiges Beispiel dafür ist die große Zahl an Basisstrukturen der Sekundärmetabolite, die allein von dem Bakterium *Sorangium cellulosum* stammen (Abbildung 4). Bis heute wurden

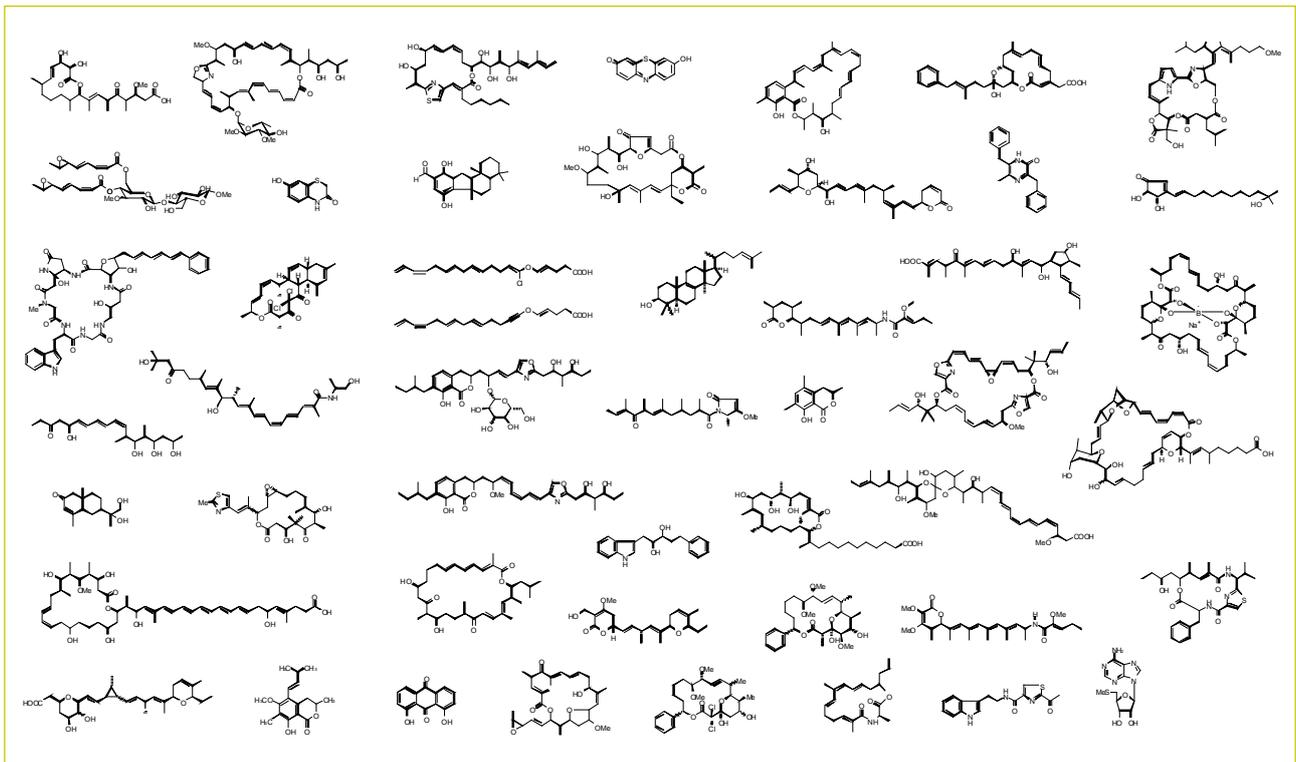


Abb. 4. Sekundärmetaboliten des Myxobakterium *Sorangium cellulosum* Grafik: HZI

mehr als 600 spezifische myxobakterielle Metaboliten bestimmt und deren Strukturen erforscht. Im Laufe der Jahre wurde eine ganze Reihe kleinerer Moleküle ermittelt und näher bestimmt, die über antitumorale, antivirale (Proteasominhibitoren), antiinfektive (Interferonregulatoren) und antibakterielle (Antibiotika, Zytolysinhibitoren, Biofilminhibitoren) Eigenschaften verfügen. Darunter war die wichtigste Entdeckung das Epothilon, eine Verbindung, die die Grundlage für die Entwicklung einer Therapie gegen aggressiven, metastatischen oder lokal fortgeschrittenen Brustkrebs bildet.

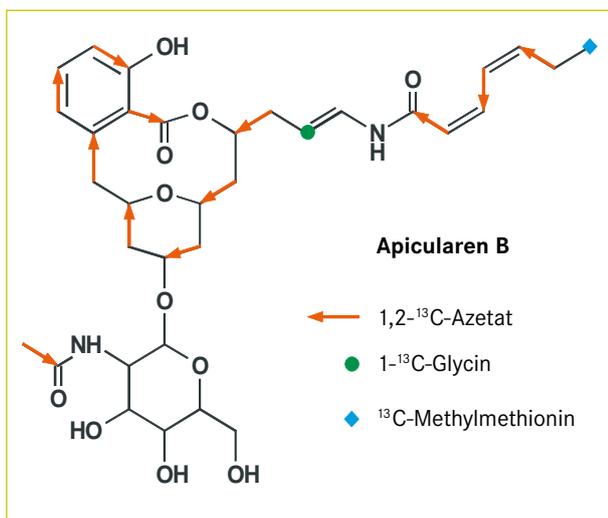


Abb. 5. Biosynthetische Präkursoren des Apicularen B Grafik: HZI

Die NMR-Spektroskopie ist desweiteren die wichtigste Methode zur Ermittlung der Struktur synthetischer Derivate natürlicher Substanzen, die zur Untersuchung der Strukturaktivitäten hergestellt wurden. Sie sind die Voraussetzung für die Entwicklung von Medikamenten und für die *a priori* Synthese chemischer Substanzen für Forschergruppen in den Bereichen Biochemie und medizinische Chemie. In der Vergangenheit wurden desweiteren bedeutende Kooperationsprojekte mit Universitäten und anderen Instituten auf den Weg gebracht, bei denen Untersuchungen von Naturstoffen eine Rolle spielen, die aus Bakterien, Pilzen, Pflanzen und Meeresbewohnern gewonnen wurden.

Biosynthetische Signalwege und Kontrolle biologischer Systeme Erkenntnisse über die Biosynthese von Sekundärmetaboliten lassen sich auch durch die Kontrolle der Stoffe nach Verabreichung von mit ¹³C angereicherten Präkursormolekülen an das Erzeugerbakterium gewinnen. Unter diesen Bedingungen werden die Präkursoren in den entsprechenden Stoff eingebaut. Infolgedessen treten verstärkte Signale im ¹³C-NMR-Spektrum auf, die auf die Kohlenstoffatome beschränkt sind, die aus dem angereicherten Material stammen. Abbildung 5 zeigt ein Beispiel für Apicularen B, das aus Azetat, Glyzin und Methionin biosynthetisch hergestellt wurde.

Der Nutzen der NMR-Spektroskopie zur Kontrolle von Änderungen im biologischen System wurde bereits früh erkannt. Dieses Verfahren wurde für die nicht invasive Untersuchung des Säuredifferenzials in Zytoplasma-Vakuolen und der Phosphatmetaboliten von Pflanzenzellen in Suspensionskul-

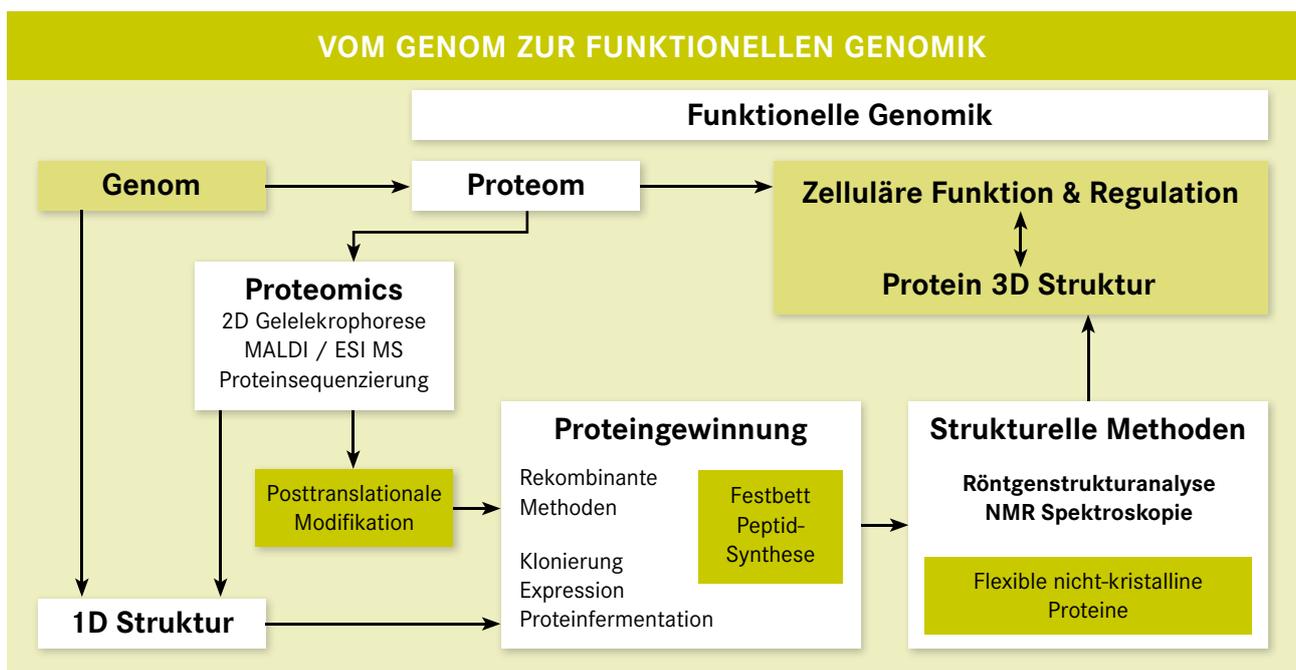


Abb. 6. Instrumentarium für die funktionelle Genomik Grafik: HZI

turen aus *Nicotiana tabacum* und Kartoffelkulturen mit Hilfe der *in vivo* ³¹P-NMR-Spektroskopie eingesetzt. In jüngster Zeit wurden die am biologischen Abbau von substituierten Aromaten beteiligten Signalwege durch Zugabe spezifischer Enzyme von bestimmten Bakterien *in situ* untersucht, um die Zwischenprodukte zu definieren und mit der ¹H-NMR-Spektroskopie die Endprodukte zu bestimmen. Daraus lassen sich direkte Erkenntnisse für die Rekonstruktion der metabolischen Netzwerke gewinnen, die in aromatischen Abbauprodukten vorkommen und eine rationale Nutzung der Eigenschaften der beteiligten Mikroorganismen ermöglichen.

Strukturbiologie: Einsatz der NMR für Proteinuntersuchungen Die Auswirkungen, die die Entschlüsselung des menschlichen und anderer Genome seit Beginn des Jahrhunderts auf die Proteinforschung hatte, sind auf die rasanten Fortschritte zurückzuführen, die in vielen Bereichen der Gerätetechnik erzielt wurden. Das wurde auch durch die Nobelpreise deutlich, die im Jahre 2002 im Fachgebiet Chemie an Fenn und Tanaka für die Entwicklung der massenspektrometrischen Analysen biologischer Makromoleküle und an Wüthrich für die Entwicklung der NMR-spektroskopischen Verfahren zur Bestimmung der drei-dimensionalen Struktur von gelösten biologischen Makromolekülen verliehen wurden. Mit Hilfe der Soft Desorption Ionization-MS-Methoden (ESI und MALDI MS) können eine eindimensionale Sequenz der Aminosäuren eines Proteins dargestellt und posttranslationale Modifikationen bestimmt werden. Sie sind die Voraussetzung für die Bestimmung der dreidimensionalen Strukturen und der sich daraus ergebenden Korrelationen mit der Zellfunktion und Zellregulierung (Abbildung 6). In diesen Berichten wurde bereits die Bedeutung der Röntgenkristallographie für die strukturelle Untersuchung von kristallinen Proteinen gezeigt. In diesem Zusammenhang wird ein alternatives Verfahren zum Einsatz gebracht, das in beispielhafter Weise den Nutzen der NMR-Spektroskopie bei der Klärung von Lösungsstrukturen kleiner flexibler Proteine verdeutlicht. Dabei handelt es sich um Moleküle, die keine Kristalle ausbilden und sich mit rekombinanten Verfahren nicht einfach erzeugen lassen.

Das HIV-Genom codiert eine Reihe von Enzymen und Strukturproteine sowie sechs Hilfsproteine. Davon ist das HIV-1-spezifische Virusprotein U (Vpu) ein auf der 81-Aminosäure der Klasse I basierendes, integrales Membranphosphoprotein, das zum Zerfall des Virusrezeptors CD4 im endoplasmatischen Retikulum führt und die Freisetzung von Viruspartikeln aus den infizierten Zellen verstärkt. Obwohl dieses flexible Protein keine Kristalle ausbildet, konnten mit Hilfe der Festkörper-Peptidsynthese ausreichend große Mengen an Proteinen und entsprechenden Fragmenten gewonnen werden. Dadurch wurden Untersuchungen mittels CD- und NMR-Spektroskopie ermöglicht. Beide Methoden

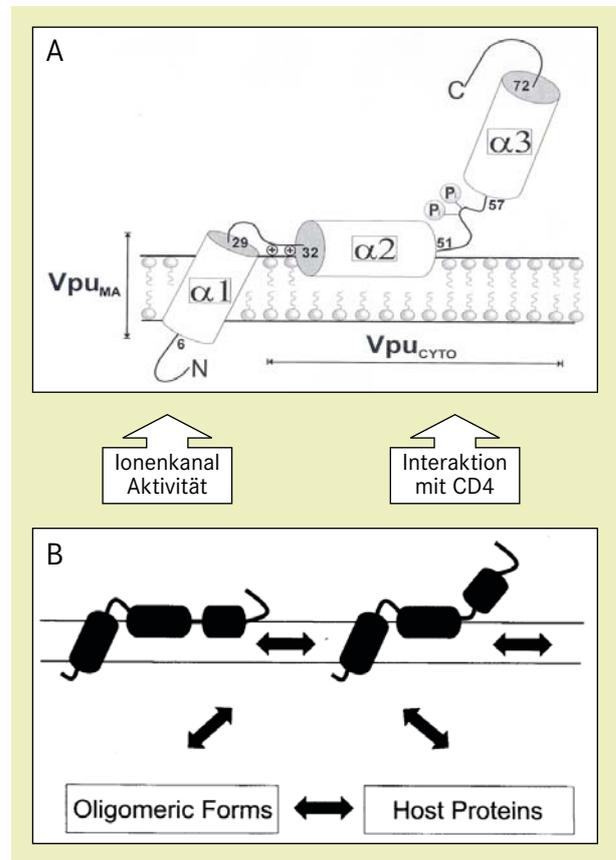


Abb. 7. Modell der membrangebundenen Struktur von monomerem Vpu (A) und dessen dynamische Formen (B) Grafik: HZI

zeigten, dass die Struktur des Moleküls von den Lösungsbedingungen abhängig war, wobei das Molekül lediglich in einer hydrophobischen, membranartigen Umgebung eine stabile Sekundärstruktur annahm. Das ist charakteristisch für viele kleine Proteine, die sich in Lösung befinden. Detaillierte 2D ¹H-NMR-Untersuchungen der C-Terminal-Domäne des 50-Aminosäure-Zytoplasmas zeigten, dass in dem am deutlichsten ausgeprägten Zustand eine genau definierte Struktur von Helix-Loop-Helix-Verbindungen vorlag, in die sich die beiden Serinreste nach der posttranslationalen Phosphorylierung zwischen die Helices setzten. Die Positionierung dieser Strukturen und die Helix der N-Terminal-Ankerdomäne in einer Umgebung, die einer zweischichtigen Membran ähnelt, wurden unter Verwendung der ¹⁵N-Festkörper-NMR-Spektroskopie in einer gerichteten Doppelschicht aus Phospholipiden erzeugt. Anhand dieser Daten war die Entwicklung eines Modells einer monomeren Struktur des zu erzeugenden Moleküls (Abbildung 7) möglich, bei dem die erste Helix (α1) der N-Terminal-Domäne eine membrandurchgängige Helix bildet, die an die erste Helix (α2) der zytosolischen Domäne gekoppelt ist, die mit ihrer Bindung parallel zur Membranoberfläche

ansetzt. Diese Struktur wird dann an die endgültige Helix ($\alpha 3$) gekoppelt, die nur schwache Wechselwirkungen mit der Membran aufweist. Eine derartige Struktur ist mit der Ionenkanalaktivität des N-Terminus, der Wechselwirkung des C-Terminus mit der zytoplasmatischen Domain von CD4 sowie mit den Anforderungen der phosphorylierten Vpu für diese Funktion kompatibel. Ähnliche Untersuchungen lieferten Erkenntnisse über die Struktur des HIV-1-Sekundärhilfsproteins Vpr wobei erst vor kurzem die ungewöhnliche Wechselwirkung mit einem Hostprotein, dem Zyklophilin A, bekannt geworden ist.

Große Proteine und Röntgenkompatibilität Es stellt sich hier die Frage, inwiefern es mit Hilfe der NMR-Spektroskopie möglich ist, Strukturdaten auch für größere Proteine zu gewinnen. Und ob die in Lösung ermittelten Strukturen auch mit denen kompatibel sind, die durch den Einsatz der Festkörper-Röntgenkristallographie ermittelt wurden. Grundsätzlich können beide Fragen mit „Ja“ beantwortet werden. Forschungslaboratorien, wie beispielsweise die Proteinproben-Produktionsanlage am HZI, können heute unter Verwendung rekombinanter Verfahren doppelt markierte ^{15}N , ^{13}C -Proteine herstellen, die für eine mehr-

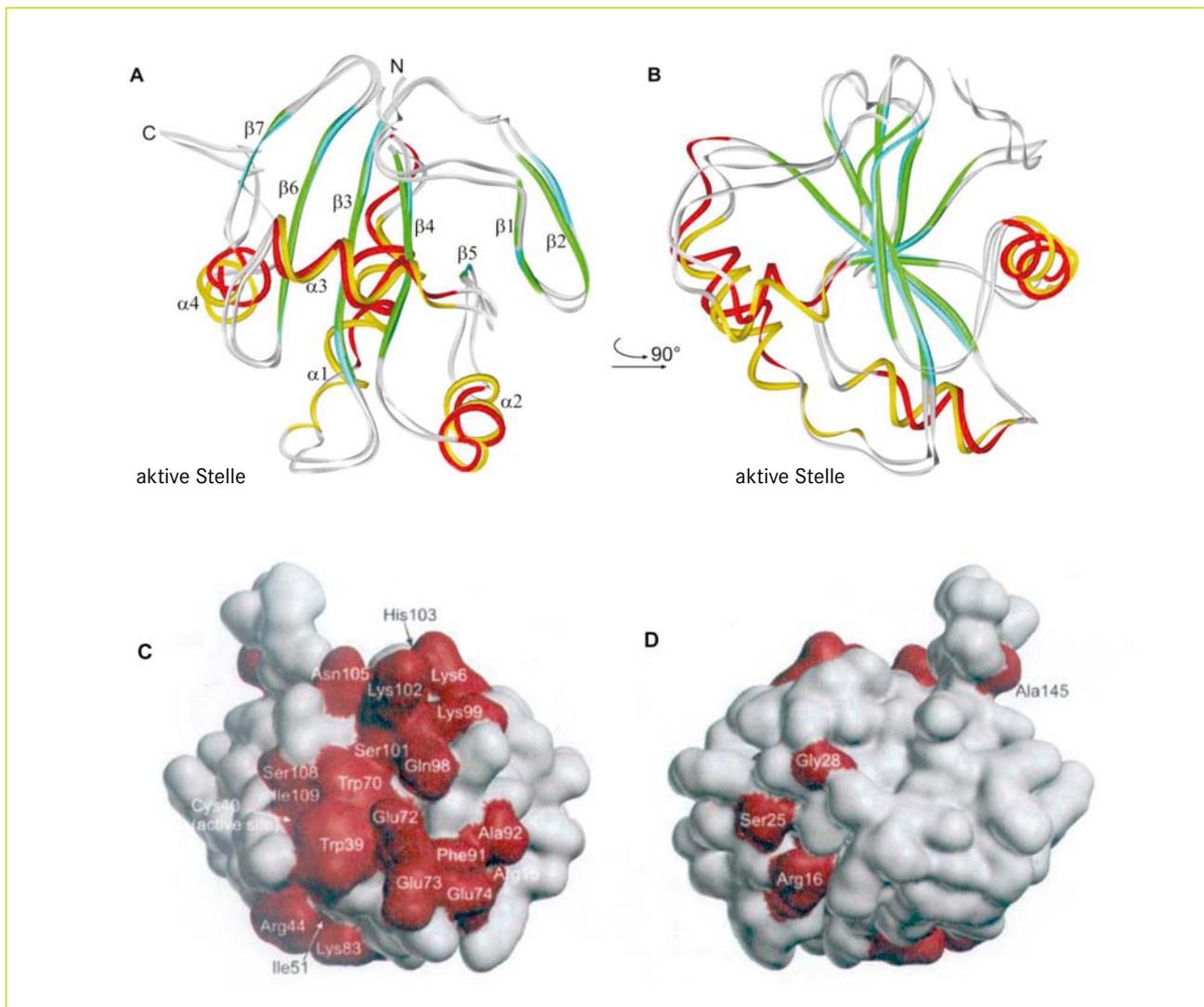


Abb. 8. Vergleich der NMR- und Röntgenbilder des Tryparedoxin (A & B), Oberflächenmodell, das die Ligandenbindungsstellen zeigt (C & D)



dimensionale, heteronukleare NMR-Untersuchung in Lösung geeignet sind. Ein herausragendes Beispiel ist die Erforschung des Tryparedoxin, eines Virulenzfaktors, der in Trypanosomatiden vorkommt und der Auslöser der Trypanosomiose (Schlafkrankheit und Morbus Chagas) und der Leishmaniose ist. Die Gesamtfaltung der Struktur, die mit Hilfe der dreidimensionalen NMR-Spektroskopie ermittelt wurde, ähnelt in großem Maße dem Aufbau der Kristallstruktur, obwohl die Regionen im Bereich der aktiven Seite in Lösung weniger gut ausgeprägt waren (Abbildung 8, A und B). Wenn die Erforschung der Struktur die einzige Zielstellung des Projektes war, wäre verständlicherweise die Röntgenkristallographie die bevorzugte Methode. Mit der NMR konnte jedoch die Bindung des inhibitorischen Substratanalogons problemlos untersucht und schwer zugängliche Bereiche auf der Proteinoberfläche mit einer funktionalen Relevanz enthüllt werden (Abbildung 8, C und D), die einen Bezugsrahmen für die Konzeption von starren und aktiveren Liganden bilden.

Ausblick Auf unabsehbare Zeit werden die Plattformtechnologien intensiv genutzt werden. Das wird auch durch die in der letzten Zeit vorgenommenen größeren Investitionen in neue Geräte unterstützt. Diese neue Technik wird für Untersuchungen am neuen Wirkstoffzentrum von großer Bedeutung sein, das sich zur Zeit in der Planungsphase befindet. Die vielschichtigen Aspekte bei der Erforschung der Strukturen altbekannter und neuer Naturstoffe aller Art werden auch weiterhin ein Hauptgebiet in der Infektionsforschung sein, wie die aktuelle Forschungsinitiative des HZI zeigt. Die weitere Verbesserung der Technologie, insbesondere der unmittelbaren Verfügbarkeit von ultra-hochfrequenten Magnetfeldern (≥ 1 GHz), eröffnet neue Möglichkeiten für die Untersuchung noch größerer Systeme, wie z.B. biomakromolekularer Verbindungen von höchster Komplexität und biomedizinischer Bedeutung mit Hilfe der NMR-Techniken, die die Röntgenuntersuchungen ergänzen. Es ist zweifellos ein weiteres wichtiges Forschungsgebiet, mit dem auch künftig maßgeblich unser Wissen über makromolekulare Strukturen und deren Wechselwirkungen in der modernen Biologie und Biomedizin bereichert wird.

Victor Wray wurde 1945 geboren und studierte Chemie an der Universität Hull, wo er 1966 den Abschluss „Bachelor of Science“ machte und 1969 den Dokortitel in Chemie erhielt. Danach arbeitete er als promovierter Wissenschaftler an der Abteilung Organische Chemie am Imperial College in London (1969-1973). Dann nahm er seine Tätigkeit in der Arbeitsgruppe für physikalische Messungen am Zentrum für molekularbiologische Forschung auf, die ein Vorläufer von GBF und HZI (1973) war. Er ist seit 1987 Leiter der Arbeitsgruppe NMR-Spektroskopie und seit 2003 Leiter der Forschungsgruppe Biophysikalische Analytik (einschließlich der Analyseplattform).

Literatur

1. Frank, R. (2007) The chemical pipeline – A research programme and infra-structure for the discovery and evaluation of new anti-infectives. *Research Report 2006-2007*, 32-43.
2. Reichenbach, H. (2007) Natural products: An indispensable source of new drugs. *Research Report 2006-2007*, 54-59.
3. Wray, V., Schiel O., Berlin, J. & Witte, L. (1985) Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance investigation of the in vivo regulation of intracellular pH in cell suspension culture of *Nicotiana tabacum*: The effect of oxygen supply, nitrogen, and external pH change. *Archive of Biochemistry and Biophysics* **236**, 731-740.
4. Pieper, D. H., Pollmann, K., Nikodem, P. Gonzalez, B. & Wray, V. (2002) Monitoring key reactions in degradation of chloroaromatics by *in situ* ^1H nuclear magnetic resonance: Solution structures of metabolites formed from cis-dienelactone, *Journal of Bacteriology*. **184**, 1466-1470.
5. Wray, V., Kinder, R., Federau, T., Henklein, P., Bechinger, B. & Schubert, U. (1999) Solution structure and orientation of the transmembrane anchor domain of the HIV-1-encoded virus protein U by high-resolution and solid-state NMR spectroscopy. *Biochemistry* **38**, 5272-5282.
6. Krumme, D., Budde, H., Hecht, H-J., Mange, U., Ohlenschläger, O. Ross, A., Wissing, J., Wray, V. & Flohé, L. (2003) NMR studies of the interaction of tryparedoxin with redox-inactive substrate homologues. *Biochemistry* **42**, 14720-14728.
7. Solbak, S. M. Ø., Reksten, T. R., Wray, V., Bruns, K., Horvli, O., Raae, A. J., Henklein, P., Röder, R., Mitzner, D., Schubert, U., Fossen, T. (2010) The intriguing cyclophilin A-HIV-1 Vpr interaction: Prolyl cis/trans isomerisation catalysis and specific binding. *BMC Structural Biology* **10**, 31.



Internationale Kooperationen am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung mit Indien und China: eine Erfolgsgeschichte

AUTOR | Prof. Dr. G. Singh Chhatwal | Abteilung für Medizinische Mikrobiologie | gsc@helmholtz-hzi.de

Mit einem Viertel aller Todesfälle weltweit stellen die Infektionskrankheiten ein ernst zu nehmendes Gesundheitsproblem dar. Viren und Bakterien brauchen weder Reisepass, Visum noch Flugticket, um von einem Land ins andere zu gelangen. Das SARS-Virus benötigte seinerzeit nur 24 Stunden von Hongkong nach Toronto. Zusätzlich zu ihrer Mobilität verfügen die Krankheitserreger über eine weitere charakteristische Eigenschaft: ihr Antigenrepertoire unterscheidet sich abhängig von ihrer geographischen Verbreitung erheblich. Es ist mittlerweile bekannt, dass Stämme derselben Spezies in ganz unterschiedlichen Varianten z.B. in China, Indien, Europa oder Nordamerika vorkommen. Daher ist für eine effektive Bekämpfung der Infektionskrankheiten ein globaler Ansatz nötig, nicht nur um Epidemien vorherzusagen und einzugrenzen, sondern auch um regionsspezifische Interventionsstrategien zu entwerfen und weiterzuentwickeln. Vor diesem Hintergrund hat es sich die Helmholtz-Gemeinschaft zur Aufgabe gemacht, internationale Kooperationen auf dem Gebiet der Gesundheitsforschung zu unterstützen und zu stärken. Im Rahmen dieser Initiative hat auch das HZI seine internationalen Kooperationen in den letzten Jahren weiter ausgebaut. Die folgenden Beispiele illustrieren dies.

Das Indo-German Science Centre for Infectious Diseases (IG-SCID): ein Paradebeispiel für internationale Kooperationen

Im Jahre 2006 präsentierten das HZI, die Medizinische Hochschule Hannover (MHH) und das Indian Council of Medical Research (ICMR) ihre Vision, ein virtuelles Zentrum für Deutsch-Indische Zusammenarbeit im Bereich der Infektionskrankheiten aufzubauen. Der Schwerpunkt sollte auf der Entwicklung neuer Diagnostika, Impfstoffe und Antiinfektiva liegen. Das Ziel war, eine starke, klinisch ausgerichtete Forschung in Indien mit neuester Technologie im Labor und im experimentellen Tiermodell an HZI und MHH zusammenzubringen. Dieser hohe Grad an Komplementarität machte das Konzept zu einer win-win-Situation. Die Vision wurde im April 2006 Wirklichkeit, als Prof. N.K. Ganguly, Generaldirektor des ICMR, und Prof. J. Mlynek, Präsident der Helmholtz-Gemeinschaft, in Gegenwart des indischen Premierministers Dr. Manmohan Singh und der deutschen Bundeskanzlerin Dr. Angela Merkel in Hannover ein Memorandum of Understanding unterzeichneten. Nach dieser Unterzeichnung ging es zügig voran und sowohl die Helmholtz-Gemeinschaft als auch das ICMR sagten die Finanzierung für das geplante Zentrum zu. Im April 2007 fand in Neu Delhi die Einweihung des Zentrum im Beisein hochrangiger Persönlichkeiten der Helmholtz-Gemeinschaft, des HZI, der MHH, des ICMR und einer Anzahl von Wissenschaftlern aus dem Gebiet der Infektionskrankheiten statt. In der Zentrale des ICMR in Neu Delhi wurde ein IG-SCID-Büro eingerichtet. Sechs Monate nach der Einweihung wurde das IG-SCID um die Jawaharlal-Nehru-Universität (JNU) erweitert. Das entsprechende Memorandum of Understanding unterzeichneten der Rektor der JNU, Dr. Rajendra Prasad, Dr. N.K. Ganguly und der Direktor des HZI Prof. Rudi Balling in Neu Delhi. Bei dieser Zeremonie waren auch Bundesbildungsministerin Dr. Annette Schavan sowie der indische Wissenschaftsminister Mr. Kapil Sibal anwesend.

Ein Zentrum mit derart hervorragenden Partnern war zwar von vornherein auf Erfolg programmiert, aber es hat sich gezeigt, dass IG-SCID zusätzlich ein Paradebeispiel für internationale Kooperation geworden ist. Das einzigartige Konzept dieses Zentrums hat maßgeblich zu seinem Erfolg beigetragen. IG-SCID finanziert gemeinsame Forschungsprojekte, die ausgezeichnete Wissenschaft und hohe Relevanz für beide Länder vereinen. Die beantragten Projekte werden in schnellen Verfahren von einem gemeinsamen, hochrangigen Lenkungsausschuss begutachtet. Neben diesen wissenschaftlichen Projekten fördert das Zentrum auch gemeinsame Workshops zu wichtigen Aspekten der Infektionskrankheiten in Indien und Deutschland. Das Zentrum legt großen Wert auf das Training junger Forscher aus beiden Ländern. Junge Forscher aus Deutschland profitieren in Indien von praxisnaher Erfahrung mit klinischer Infektionsforschung und epidemiologischer Feldarbeit, und indische Forscher sammeln in Braunschweig und Hannover Erfahrungen in modernen Labor- und neuen Tierversuchstechnologien. IG-SCID hat kürzlich ein neues Stipendienprogramm eingerichtet, das Wissenschaftlern aus Indien



Abb. 1. Unterzeichnung der Absichtserklärung durch Prof. Ganguly (links) und Prof. Mlynek im April 2006 in Hannover Foto: HZI



Abb. 2. Einweihung von IG-SCID im Mai 2007 in New Delhi (von links: Prof. Balling, Prof. Chhatwal, Prof. Mlynek, Prof. Ganguly und Prof. Hasnain; Photo: ICMR) Foto: ICMR



Abb. 3. Erweiterung des IG-SCID auf die Jawaharlal-Nehru-Universität während des Besuchs von Prof. Dr. Annette Schavan, Bundesministerin für Bildung und Forschung, in New Delhi im Oktober 2007 Foto: HZI



Abb. 4. Eine Veranstaltung zur Präsentation der wissenschaftlichen Aktivitäten von IG-SCID anlässlich des Besuchs von David McAllister, Ministerpräsident von Niedersachsen, in Neu Delhi im September 2010 (Prof. Heinz, Minister McAllister, Prof. Chhatwal) Foto: Henning Noske



Abb. 5. Deutsch-chinesisches Treffen in Guangzhou, China, im Dezember 2010. Deutscher Koordinator war Prof. Chhatwal, chinesischer Koordinator Prof. George Fu Gao, Vizepräsident des Beijing Institute of Life Sciences, Chinese Academy of Sciences. Prof. Han Jianguo, Direktor des Sino-German Center, nahm ebenfalls an dem Treffen teil. Foto: HZI

und Deutschland gegenseitige Forschungsaufenthalte von bis zu drei Monaten ermöglicht. Da beide deutschen Partner aus Niedersachsen kommen, wurden die Aktivitäten von IG-SCID während einer Besuchsreise von Ministerpräsident David McAllister im September 2010 in Delhi vorgestellt. Das Zentrum ist eine sinnvolle Ergänzung zu den gemeinsamen Aktivitäten zwischen Niedersachsen und Indien auf dem Gebiet Wissenschaft und Forschung.

Auf beiden Seiten besteht der Wunsch, diese Kooperation fortzusetzen und nach Möglichkeiten zu suchen, dieses virtuelle Zentrum in ein reales Zentrum umzuwandeln, vorzugsweise mit Sitz in Indien.

Kooperation mit China: eine wichtige Initiative Infektionskrankheiten stellen auch in China ein bedeutendes Gesundheitsproblem dar. Im letzten Jahrzehnt wurden die Forschungsaktivitäten auf diesem Gebiet auf chinesischer Seite massiv verstärkt. Die Ergebnisse, die aus dieser Forschung resultieren, zeigen, dass Virenstämme in China nicht nur bezüglich ihres Virulenzrepertoires variieren, sondern auch unterschiedliche klinische Manifestationen verursachen. Um globale Kontrollstrategien gegen Infektionskrankheiten zu entwickeln, ist eine starke Zusammenarbeit mit China von größter Bedeutung. Daher hat das HZI mit der Chinese Academy of Science eine Initiative zur intensiven Zusammenarbeit gestartet. Diese Initiative hat bereits zu zwei deutsch-chinesischen Workshops geführt: 2009 in Goslar und 2010 in Guangzhou. Die Aktivitäten wurden vollständig vom Chinese-German Centre for Science Promotion in Peking finanziert. Das Zentrum hat die Notwendigkeit einer solchen Zusammenarbeit eindeutig anerkannt. Neben dem HZI waren auf deutscher Seite auch die Justus-Liebig-Universität Gießen, die RWTH Aachen, die TiHo Hannover und die MHH in den Workshops vertreten. Auf chinesischer Seite nahmen Vertreter verschiedener Institute der Chinese Academy of Sciences teil. Die Workshops führten zu einer Reihe bilateraler Kooperationen, ein Antrag für ein größeres deutsch-chinesisches Projekt wird gerade gestellt. Wir hoffen, dass die Zusammenarbeit mit China eine wertvolle Ergänzung für unsere anderen internationalen Kooperationen sein wird.

FOKUS

BERICHTE AUS DER FORSCHUNG

SONDERBEITRÄGE



Fotos von links nach rechts: Lisa Schreiber beim magnetischen Sortieren von Zellen unter einer sterilen Werkbank | Die Assistenz der HIPS-Institutsleitung (von links nach rechts): Verwaltungsleiter David Hofmann, Persönliche Assistentin Birgitta Lelarge und Wissenschaftlicher Referent Dr. Markus Ehse | Dr. Leonor Gama-Norton beobachtet den Doktoranden Marcin Cebula während seiner Arbeit Fotos: HZI, Krämer (li) | HIPS/HZI (mi) | HZI, Scheibe (re)



- 64 **Infektion und Immunität**
- 114 **Neue Projektgruppen**
- 121 **PoF II – Unabhängige Forschung**
- 125 **Technologische Plattformen**
- 132 **Das Helmholtz-Institut für Pharmazeutische
Forschung Saarland (HIPS)**
- 138 **TWINCORE, Zentrum für Experimentelle und
Klinische Infektionsforschung GmbH**
- 148 **Veröffentlichungen 2010-2011**



INFEKTION UND IMMUNITÄT

PROGRAMMSPRECHER | Prof. Dr. Dirk Heinz | Abteilung für Molekulare Strukturbiologie | dih@helmholtz-hzi.de

Infektionen sind nach wie vor die dritthäufigste Todesursache weltweit und stellen somit heute und in Zukunft eine ernste Bedrohung für die Menschheit dar. Trotz der Entdeckung und Entwicklung von Antibiotika, Impfstoffen und verbesserter Hygienemaßnahmen werden wir mit der Tatsache konfrontiert, dass auch viele für kontrollierbar gehaltene Infektionskrankheiten wieder vermehrt auftreten. Zunehmend vorkommende Antibiotika-Resistenzen, erleichterte Verbreitungswege für Infektionserreger durch Globalisierung und Klimawandel sowie einer stetig älter werdenden Bevölkerung vor allem in den Industrieländern machen die Prävention und Therapie von Infektionskrankheiten bei Mensch und Tier zu einer großen Herausforderung. Der Einfluss dieser anthropogenen Faktoren wird durch epidemische Ausbrüche vorher unbekannter Krankheiten, beispielsweise neuer zoonotischer Infektionen wie SARS und Vogel- oder Schweinegrippe, verdeutlicht. Überdies treten Infektionskrankheiten wie Tuberkulose, die in der Vergangenheit erfolgreich bekämpft werden konnten, als globale Bedrohungen wieder auf.

Neben dem vermehrten Auftreten epidemischer Viruserkrankungen stehen die Industrieländer vor neuen Herausforderungen in der Bekämpfung und Eindämmung bakterieller Infektionen. Mit den Fortschritten in der modernen Medizin wächst die Zahl der immunsupprimierten Patienten, die für opportunistische Infektionen besonders empfänglich sind (z.B. Transplantationspatienten oder Patienten auf Intensivstationen). Die abnehmende Immunabwehr in den wachsenden älteren Bevölkerungsschichten führt zudem zu einer erhöhten Infektionsanfälligkeit. Das Auftreten von Resistenzen gegen nahezu alle momentan auf dem Markt befindlichen Antibiotika ist darüber hinaus eine immense Belastung für die Gesundheitssysteme. Die Entwicklung neuer Strategien für die Diagnose, Prävention und Therapie von Infektionskrankheiten stellt daher eine essentielle Maßnahme zur Bekämpfung dieser Bedrohungen für die öffentliche Gesundheit dar.

Das HZI bearbeitet gemeinsam mit seinem Tochterinstitut, dem Helmholtz Institut für Pharmazeutische Forschung Saarland (HIPS), und seinem Partnerinstitut TWINCORE (Zentrum für Experimentelle und Klinische Infektionsforschung) einige der wichtigsten Fragen in der Infektionsforschung. Auf der Basis einer starken Grundlagenforschung werden neue Strategien zur Prävention und Therapie mikrobieller Infektionen entwickelt und die Translation der neu gewonnenen Erkenntnisse in die klinische Anwendung gemeinsam vorangetrieben. Zu diesem Zweck hat das HZI das Programm „Infektion und Immunität“ ins Leben gerufen, das fünf wichtige Topics der Infektionsforschung umfasst:

- Mikrobielle Pathogenese
- Wirt-Pathogen-Interaktionen
- Entzündung und Immunität
- Strategien für Prävention und Therapie
- Pharmazeutische Forschung

Das ehemalige Topic „Translatorische Infektionsforschung“ ist zu einer Topic-übergreifenden Aktivität geworden, da es für alle fünf Topics in hohem Grade relevant ist. Die komplette Infrastruktur und die Sachkenntnis, die zur Planung, Vorbereitung und Durchführung klinischer Studien notwendig sind, wurden zusammen mit der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH) entwickelt.

Derzeit befindet sich ein Zentrum für frühe klinische Studien im Aufbau (Clinical Trial Centre Hannover, CRCH), das als Gemeinschaftsprojekt des Fraunhofer-Instituts für Toxikologie und Experimentelle Medizin (ITEM), der MHH und des HZI realisiert wird.

Das Topic **Mikrobielle Pathogenese** behandelt die grundlegende Frage, wie bakterielle Erreger Krankheiten verursachen. Adhärenz an die Wirtszellen, Invasion, intrazelluläres Überleben, Verbreitung und Immunevasion sind Strategien der Mikroorganismen, um Infektionen im Wirt zu etablieren. Das Verständnis dieser komplexen Prozesse wird durch die Erforschung der Pathogenitätsmechanismen, der Rolle der spezifischen Virulenzfaktoren und Diversität der Erreger erreicht. In diesem Topic untersuchte bakterielle Krankheitserreger schließen Streptokokken als Auslöser für Atemwegserkrankungen und invasive Krankheiten, Yersinien und Listerien als Enteropathogene und Modellkeime sowie das *Mycobacterium tuberculosis*, einen Erreger der Tuberkulose, mit ein. Moderne Technologien einschließlich Strukturbiochemie, Elektronenmikroskopie und Proteomikverfahren werden für die eingehende Untersuchung der jeweiligen molekularen Prozesse verwendet.

Die Studien im Topic **Wirt-Pathogen-Wechselwirkungen** konzentrieren sich auf das Verständnis der Wechselwirkung zwischen dem infizierten Wirt und den bakteriellen oder viralen Krankheitserregern. Die genetischen und zellulären Faktoren, welche den Infektionsprozess steuern, werden in komplexen Modellsystemen wie der Maus erforscht. Dieses schließt auch die Diversität der Mikrobengemeinschaften innerhalb des Wirtes ein, die für die Bildung beständiger Biofilme auf medizinischen Implantaten oder in der Lunge von Patienten mit zystischer Fibrose verantwortlich sein können und die auf antimikrobielle Behandlungen in der Regel nicht ansprechen. Breit angelegte epidemiologische Studien, wie die geplante Nationale Kohorte, die helfen sollen, Wirtskomponenten zu verstehen, welche die Anfälligkeit oder Resistenz gegenüber Erregern vermitteln, sind ebenfalls Teil dieses Topics.

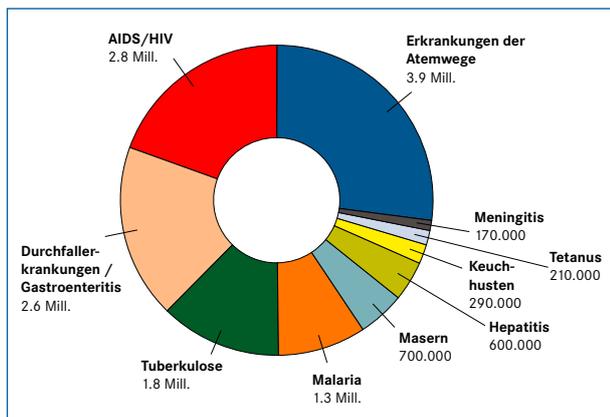
Das Topic **Entzündung und Immunität** befasst sich mit der Immunabwehr gegen Erreger. Ein Schwerpunkt ist das Verständnis der Regulation des Interferon (IFN)-Systems, das einen wichtigen Bestandteil der frühen Immunantwort darstellt und als Vermittler von Entzündungsprozessen fungiert. Die T-Zellen als Schlüsselzellen der adaptiven Immunantwort werden hinsichtlich ihrer bedeutenden Rolle beim Aufrechterhalten von Toleranz und Autoimmunität erforscht. In diesem Topic neu entwickelte Technologien beinhalten u.a. die Entwicklung neuartiger Zelllinien und humanisierter Mäuse als Modelle für Infektion und Wirtsantwort. Moderne Ansätze der Systembiologie werden verwendet, um die molekularen Signalwege, welche die Immunität steuern, als Modelle *in silico* nachzubilden.

Das zentrale Ziel des Topics **Strategien für Prävention und Therapie** ist die Entwicklung innovativer Werkzeuge und Ideen zur Vorbeugung, Management und Kontrolle von Infektionen und infektionsassoziierten Erkrankungen. Ein Hauptforschungsschwerpunkt ist die Entwicklung neuer *Antigen-Delivery*-Systeme und Adjuvantien, insbesondere solcher, die für die Entwicklung von mukosalen Impfstoffen nutzbar sind. Dies geht einher mit der Etablierung von präklinischen Validierungsmodellen, basierend auf humanisierten Mäusen, für Screening, Auswahl und Priorisierung von Wirkstoffkandidaten. Neue für Reproduktion und Ausbreitung des Hepatitis C-Virus (HCV) relevante *drug targets* werden unter Verwendung eines zellbasierten HCV-Modells erforscht. Außerdem werden Faktoren in Virus und Wirt untersucht, die Qualität und Quantität antiviraler Zytokinantworten und den Schutzmechanismus von IFN beeinflussen.

Das Topic **Pharmazeutische Forschung** strebt an, die Lücke zwischen biologischer und biochemischer Grundlagenforschung und klinischer Anwendung durch die stärkere Integration der Wirkstoffforschung zu schließen sowie eine frühe Interaktion mit der Pharmaindustrie zu initiieren. Schwerpunkt der Arbeiten ist die Identifikation von Naturstoffen und chemisch synthetisierter Substanzen als bioaktive Leitstrukturen und ihre Weiterentwicklung mit Hilfe von medizinischer Chemie, Totalsynthesen und biosynthetischer Ansätze. Schließlich beinhalten weitere Studien die Optimierung der pharmakokinetischen Eigenschaften, um den Transport vielversprechender Substanzen an ihre Zielorte zu gewährleisten.

Mit dem Programm „**Infektion und Immunität**“ thematisiert das HZI aktuelle und zukünftige Probleme der Infektionsforschung, nicht nur durch die bestehende Forschungsaktivität und Expertise, sondern auch durch die umfangreiche Implementierung neuer, komplementärer Initiativen zu aktuellen Forschungsthemen. Diese gipfeln in der Bereitstellung einer Pipeline für die Entwicklung neuartiger Antiinfektiva und ihrer raschen Translation in die klinische Anwendung.

Momentan werden am HZI die Expertise und Infrastruktur im Bereich der funktionellen Genom- und Proteomforschung signifikant verstärkt, um neue Ansätze zur Aufklärung von Wirt-Pathogen-Wechselwirkungen zu verfolgen. Diese werden für die Identifizierung und Charakterisierung von neuen *drug targets* genutzt. Forschungsarbeiten zur Entdeckung und Entwicklung neuartiger Antiinfektiva werden intensiviert und durch die Nutzung des enormen genetischen Potenzials von Mikroorganismen zur Produktion bioaktiver Substanzen zudem erheblich erweitert. Diese Maßnahmen werden die Entwicklung therapeutischer Strategien mit dem Ziel einer schnelleren Translation in die Klinik weiter beschleunigen. Im Rahmen des in Gründung befindlichen Deutschen Zentrums für Infektionsforschung (DZIF) wird das HZI insbesondere seine Stärken in der Naturstoffforschung für die Entwicklung neuer Antiinfektiva und seine Expertise in der Grundlagenforschung bakterieller und viraler Infektionen einbringen. Zusammen mit seinen Partnern wie der MHH, der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) und der Technischen Universität Braunschweig wird das HZI seine Aktivitäten in der translationalen Infektionsforschung in der Region Braunschweig-Hannover und darüber hinaus erheblich erweitern, um eine effiziente Verwertung von Ergebnissen aus der Grundlagenforschung zu ermöglichen.



Die wichtigsten Infektionskrankheiten	Todesfälle/Jahr	Jahr
Erkrankungen der Atemwege	3.900.000	2002
HIV/AIDS	2.400.000 -3.300.000	2001-2009
Durchfallerkrankungen/Gastroenteritis	1.800.000 -2.600.000	2002-2009
Tuberkulose	1.600.000 -3.000.000	2001-2009
Malaria	1.300.000 -2.700.000	2002-2009
Masern	700.000	2001
Hepatitis	520.000 -700.000	2005
Pertussis/Keuchhusten	290.000	2002
Tetanus	210.000	2002
Meningitis	170.000	2002

Infektionskrankheiten weltweit: Todesfälle pro Jahr Quelle: WHO (2001-2009)



01 Mikrobielle Pathogenese

THEMENSPRECHER | Prof. Dr. G. Singh Chhatwal | Abteilung für Medizinische Mikrobiologie | gsc@helmholtz-hzi.de

Trotz der Verfügbarkeit einer großen Anzahl von Antibiotika und antiviralen Wirkstoffen steigt die Belastung durch Infektionskrankheiten kontinuierlich und beeinträchtigt die Errungenschaften der medizinischen Versorgung. Aufgrund der fortgeschrittenen medizinischen Methoden treten chronisch persistente Infektionen immer öfter zutage und stellen eine erhebliche Herausforderung für die Mediziner dar. Außerdem sind die zunehmenden Resistenzen der Erreger gegen Antibiotika ein weiterer Grund zur Besorgnis. Besonders in Krankenhäusern werden häufig multi- und panresistente Pathogene identifiziert. Wegen der damit einhergehenden Abnahme der therapeutischen Möglichkeiten ist die Entwicklung alternativer Behandlungsstrategien dringend erforderlich. Um diese Herausforderungen meistern zu können, ist ein detailliertes Wissen über die Pathogenitätsmechanismen von größter Bedeutung. Adhärenz, Invasion, intrazelluläres Überleben, Umgehung der Immunantwort – insbesondere der intrazellulären Immunabwehr – und Persistenz in Biofilmen sind nur einige der Strategien, die von Mikroorganismen zur Etablierung der Infektion im Wirt angewendet werden. Darüber hinaus gewinnt die bisher vernachlässigte Trägerphase einiger Mikroorganismen wegen ihrer mutmaßlichen Beteiligung an latenten Infektionen zunehmend an Bedeutung. Ein weiteres Problem ist die Diversität vieler infektiöser Organismen. Viele bakterielle und virale Spezies haben hunderte von verschiedenen Serotypen mit hoher Antigenvariation, die die Entwicklung effektiver Therapien erschwert. Deshalb muss ein multidisziplinärer Ansatz angewendet werden, um die Pathogenitätsmechanismen von Mikroorganismen umfassend zu verstehen.

Hauptziel dieses Topics ist eine in die Tiefe gehende Studie der Biologie pathogener Mikroorganismen und ihrer Interaktionen mit der Wirtszelle. Das Topic beinhaltet folgende Forschungsthemen:

Untersuchung der Wirt-Pathogen-Interaktionen auf molekularer und zellulärer Ebene

Im Laufe ihrer Koevolution mit dem Wirt haben pathogene Bakterien ausgeklügelte Mechanismen entwickelt, um Wirtszellen und das Immunsystem für ihre Zwecke zu nutzen. Intrazelluläres Überleben, Dissemination im Wirt und Pathogenpersistenz erfordern eine komplexe Serie von Interaktionen mit der Wirtszelle. Ein primäres Ziel ist das Zytoskelett, das an zahlreichen zellulären Funktionen und Prozessen beteiligt ist, die von der intrinsischen Dynamik seiner Komponenten, insbesondere dem Aktin-System, abhängen. Eine große Anzahl aktinbindender Proteine sind beschrieben, die die dynamische Reorganisation des Zytoskeletts regulieren. Dieser Forschungsbereich befasst sich mit der Aufklärung exakter Signalwege und Prinzipien der Kontrolle der Aktinpolymerisation. Während der zerstörerische Eingriff in das Aktinsystem durch Pathogene schon lange Gegenstand des Interesses war, ist die Beteiligung des dynamischen mikrotubulären Systems zur bakteriellen Pathogenität als ein aufstrebendes neues und wichtiges Gebiet der Infektionsforschung Bestandteil dieses Topics. *Lysteria monocytogenes* und *Yersinia enterocolitica* sind die Haupterreger, die in diesem Themenbereich behandelt werden.

Identifikation neuer Virulenzfaktoren pathogener Bakterien

Pathogene Mikroorganismen produzieren eine Vielfalt von Virulenzfaktoren mit diversen Funktionen in Prozessen wie Adhärenz, Invasion, intrazellulärem Überleben, Umgehung der Immunantwort und bakterieller Kommunikation. Ihre funktionelle Charakterisierung wird nicht nur zum Verständnis der Pathogenität beitragen, sondern auch aussichtsreiche Kandidaten für die Entwicklung von Impfstoffen, Diagnostika und neuen Therapeutika identifizieren. Fibronektin, Kollagen und Plasminogen sind wichtige Bestandteile der Extrazellulären Matrix und bekannt dafür, direkt an Wirt-Pathogen-Interaktionen beteiligt zu sein. Kollagenbindung an Bakterien spielt eine Rolle in bestimmten Autoimmunmanifestationen, und die durch bakterielle Proteine induzierte Aktivierung von Plasminogen ist ausschlaggebend in der Gewebsinvasion. Der Hauptfokus dieses Forschungsfeldes liegt auf den Virulenzfaktoren von Streptokokken und Yersinien.

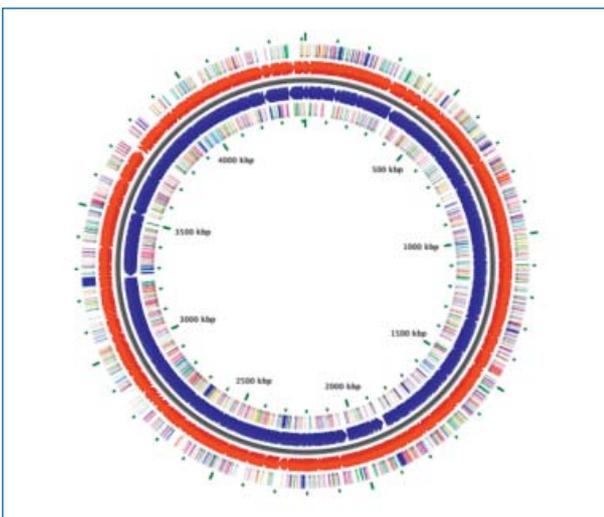
Analyse bakterieller Virulenz mittels Proteomics

Der Modellorganismus *L. monocytogenes* wird in diesem Forschungsthema genutzt, um die zeitliche und räumliche Dynamik von Wirt-Pathogen-Interaktionen auf Proteinebene aufzuklären. Speziell wird das Effektor-vermittelte Wirtszellsignalling mittels qualitativer Phosphokinomanalyse studiert. Weil das Voranschreiten vom ersten Erwerb von *P. aeruginosa* bis zur nachhaltigen Kolonisierung der Lunge von Patienten mit Zystischer Fibrose (CF) direkt mit der Überlebensrate korreliert, wird in Kooperation mit der Ambulanz der Medizinischen Hochschule Hannover ein hochsensitiver Immunoproteom Workflow zur Identifizierung diagnostischer und prognostischer antigener Marker etabliert. Des Weiteren untersucht das Projekt Signaltransduktionsprozesse, die für das bakterielle Pathogen *P. aeruginosa* und Epithelzellen von CF-Patienten spezifisch sind.

Strukturelle Analyse von Proteinen, die an Wirt-Pathogen-Interaktionen beteiligt sind

Die Aufklärung von Wirt-Pathogen-Interaktionen unter atomarer Auflösung liefert mechanistische Einsichten, die der Entwicklung neuer Ansätze zum Eingriff in den Infektionsprozess dienen. Die 3D-Strukturen mikrobieller Virulenzfaktoren und – wenn bekannt – ihrer Komplexe mit Wirtszellinteraktionspartnern und Rezeptoren werden mit Hilfe der etablierten Techniken der Röntgenkristallographie und der NMR-Spektroskopie mit hoher Auflösung bestimmt. Der Hauptschwerpunkt liegt auf Virulenzfaktoren, die zu mikrobieller Adhärenz und Invasion und zum Umbau des Wirtszellzytoskeletts beitragen, sowie auf Komponenten und Effektoren von Type-III-Sekretionssystemen, Schlüssel-Genregulatoren mikrobieller Virulenz sowie Prionproteinen.

Die oben genannten Forschungsfelder werden von einem multidisziplinären Team auf Projektebene bearbeitet. Die beteiligten Wissenschaftler gehören zu verschiedenen Abteilungen und Forschungsgruppen des HZI und bringen eine breitgefächerte Expertise mit. Die Highlights der auf Projektebene gewonnenen Ergebnisse sind in den folgenden Projektberichten beschrieben.



Genomkarte eines hochinfektösen klinischen *Mycobacterium tuberculosis*-Isolates aus Lateinamerika. Gene verschiedener funktioneller Kategorien sind in verschiedenen Farben dargestellt. (siehe Bericht Seite 80)



01.1 Strukturelle Analyse von Virulenzfaktoren

PROJEKTLEITER | Prof. Dr. Dirk Heinz | Abteilung für Molekulare Strukturbiologie | dih@helmholtz-hzi.de

PROJEKTMITARBEITER | Davide Ferraris | Thomas Heidler | Dr. Christian Kambach | Dr. Björn Klink | Dr. Jörn Krauße | Dr. Anja Menzel | Nick Quade | Dr. Stefan Schmelz | Ulrich Wiesand

Pathogene Bakterien nutzen ein Arsenal an Virulenzfaktoren, um natürliche Barrieren des Wirtes zu überwinden, Abwehrmechanismen zu blockieren oder zu umgehen und um Wirtsprozesse zu ihrem eigenen Vorteil umzuprogrammieren. Da diese Faktoren meist in der Wirtszelle fehlen, sind sie potenzielle Zielmoleküle für neue Antibiotika. Das Ziel dieses Projektes ist es, durch Röntgenstrukturanalyse mikrobieller Virulenzfaktoren im Komplex mit ihren Wirtsrezeptoren ein möglichst präzises Bild der Pathogen-Wirt-Interaktionen während des Infektionsprozesses zu gewinnen.

Listeria InlB aktiviert die humane Rezeptor-Tyrosin-Kinase Met durch Dimerisierung *L. monocytogenes* ist ein gefährlicher Lebensmittelkeim, der in Neugeborenen, älteren Menschen und immungeschwächten Individuen Listeriose auslösen kann – eine systemische Krankheit mit hoher Sterblichkeitsrate. Die Fähigkeit des Bakteriums, Wirtszellbarrieren zu überwinden, hängt essenziell von zwei Invasinen ab, die an der Oberfläche des Bakteriums lokalisiert sind: den Internalinen A und B (InlB). InlB wechselwirkt dabei mit der Rezeptor-Tyrosin-Kinase Met, dem natürlichen Rezeptor des Hepatozyten-Wachstumsfaktors (HGF). Aus der Struktur des InlB/Met Komplexes, die wir im Jahre 2007 aufklären konnten, ging der Mechanismus der Met-Aktivierung noch nicht zweifelsfrei hervor. In einer zweiten Kristallform des Komplexes konnten wir ein Met/InlB/InlB/Met-Dimer identifizieren, das mit einer Rezeptor-Aktivierung kompatibel ist. Das InlB-Dimer-Arrangement konnte auch in verschiedenen InlB-Kristallformen gefunden werden. Durch Disulfid-Crosslinking von InlB (Abb. 1) konnten wir kürzlich die Rolle dieser InlB-Dimerisierung für die Met-Aktivierung bestätigen. Das kovalent verbrückte InlB-Dimer zeigte sogar eine stärkere Met-Aktivierung als HGF. Im Gegensatz dazu führte die Schwächung der InlB-Wechselwirkungsfläche durch Einführung gegenüberliegender, positiver Ladungen zu einer vollständigen Inaktivierung des Rezeptors.

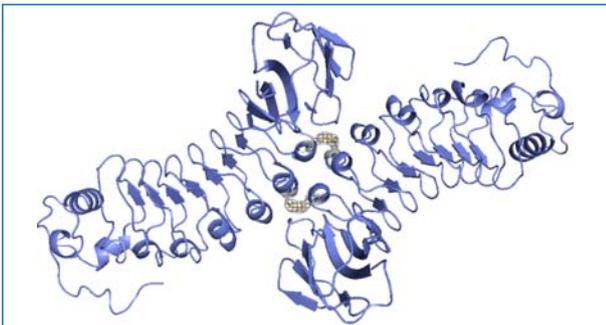


Abb. 1. Struktur vom InlB Dimer (blau), das durch zwei Disulfidbrücken kovalent verbunden ist (gelbe Verbindung in einem Feld hoher Elektronendichte (graues Netz)).

Eine neue Klasse bakterieller Guanin-Austausch-Faktoren für humane GTPasen Die Dynamik des Aktin-Zytoskeletts ist essenziell für Zellteilung, Motilität oder interzelluläre Kommunikation. Sie ist strikt über zahlreiche Signaltransduktionswege reguliert, an denen Hunderte verschiedener Aktin-bindender Proteine beteiligt sind. Die meisten Signaltransduktionswege konvergieren auf kleinen GTPasen der Rho-Familie, die als molekulare Schalter verschiedene Aktin-Filament-Strukturen induzieren. Rho GTPasen sind wichtige Ziele von Pathogenen, welche die Signaltransduktionswege über Virulenzfaktoren beeinflussen, die wiederum die Wirkung Rho-interagierender Proteine simulieren. *Shigella flexneri* IpgB1 und IpgB2 sowie Map aus pathogenen *E. coli* sind prototypische Mitglieder einer faszinierenden neuen Familie bakterieller Effektoren, die ursprünglich als GTPase-Nachahmer klassifiziert wurden. Sie induzieren Filopodien (Map) oder Lamellipodien und Stressfasern, was für IpgB1 und IpgB2 jeweils Rac1 bzw. RhoA-Aktivität anzeigt. Wir haben die Kristallstrukturen von IpgB2 und seines Komplexes mit humanem RhoA gelöst (Abb. 2). Sie belegen, dass IpgB2 ein Aktivator (Guanin-nukleotid austauschfaktor, GEF) und kein Nachahmer von RhoA ist. Strukturen des Komplexes in verschiedenen Nukleotid-gebundenen Zuständen enthüllten den molekularen Mechanismus der GDP-Dissoziation, der Grundvoraussetzung für die nachfolgende GTP-Bindung an RhoA.



Abb. 2. Struktur des Komplexes zwischen IpgB2 (blau) und RhoA (braun). GDP ist orange gefärbt und das GDP-koordinierende Mg^{2+} -Ion als gelbe Kugel dargestellt. Die Switch (Schalter)-I-Region von RhoA ist als gelber Loop (Schleife) und die Switch-II-Region als grüner Loop dargestellt. Der „katalytische Loop“ von IpgB2 ist rot.

Ferraris, D. M., Gherardi, E., Di, Y., Heinz, D. W. & Niemann, H. N. (2010). Ligand-mediated dimerization of the Met receptor tyrosine kinase by the bacterial invasion protein InlB. *Journal of Molecular Biology* 395, 522-532.

Klink, B. U., Barden, S., Heidler, T. V., Borchers, C., Ladwein, M., Stradal, T. E., Rottner, K. & Heinz, D. W. (2010). Structure of *Shigella* IpgB2 in complex with human RhoA: Implications for the mechanism of bacterial GEF-mimicry. *Journal of Biological Chemistry* 285, 17197-17208.



01.2 Virulenzfaktoren von Streptokokken und Pneumokokken

PROJEKTLEITER | Prof. Dr. G. Singh Chhatwal | Abteilung für Medizinische Mikrobiologie | gsc@helmholtz-hzi.de

PROJEKTMITARBEITER | Silva Amelung | Dr. René Bergmann | Dr. Simone Bergmann | Dr. Marcus Fulde | Angela Hitzmann | Melanie Lüttge | Dr. Andreas Nerlich | Dr. Patric Nitsche-Schmitz | Priv.-Doz. Dr. Manfred Rohde | Dr. Vivek Sagar | Dr. Susanne Talay

Nicht nur *Streptococcus pyogenes* und *S. pneumoniae* (Pneumokokken) lösen schwere Infektions- und Folgeerkrankungen im Menschen aus, auch Gruppe C- und G-Streptokokken wie *S. dysgalactiae* ssp. *equisimilis* (SDSE), *S. anginosus* oder *S. canis* sind aufstrebende Humanpathogene. So wird SDSE mit rheumatischen Herzerkrankungen in Verbindung gebracht. Der Begriff „Oralstreptokokken“ umfasst Arten, die Karies, aber auch lebensbedrohliche systemische Infektionen verursachen. Trotz verfügbarer Antibiotika bleibt die Gesundheits- und Lebensgefährdung durch Streptokokken sehr hoch und schafft einen Bedarf an alternativen Therapien. Gegenwärtige Highlights unseres Projektes, das neue Pathomechanismen aufklärt und Wege zu neuen Therapieansätzen aufzeigt, sind:

Vernachlässigte Erkrankungen Wir konnten zeigen, dass Oralstreptokokken einen Pathomechanismus besitzen, der bislang nur für *S. pyogenes* und *S. pneumoniae* beschrieben war. Er beruht auf der Bindung und Aktivierung von Plasminogen aus humanem Blut. Bakterielle Oberflächenproteine vermitteln diesen Prozess, der den Streptokokken eine gewebezersetzende Eigenschaft verleiht (Abb. 1), ihre Ausbreitung im Wirt fördert und so ihre Pathogenität erhöht. Besonders effizient sind dabei diverse M-Proteine, die in *S. pyogenes* und - wie wir kürzlich nachweisen konnten - in SDSE und *S. canis* vorkommen.

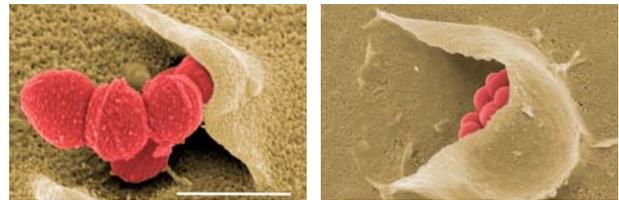


Aktiviertes Plasmin(ogen) auf der Bakterienoberfläche (hier: *S. canis*) zersetzt Fibrin und kann so die Verbreitung des Erregers im Patienten fördern. Foto: HZI, Rohde

Die Rolle der verschiedenen Gruppe C- und G- Streptokokken bei Humaninfektionen ist nur unvollständig untersucht. Wir haben gezeigt, dass in Südindien, wo solche Infektionen sehr häufig sind, 80% der Fälle durch SDSE verursacht werden. Überraschend war, dass *S. anginosus* die Ursache für die übrigen 20% der Infektionen ist. Deren Diagnose ist bislang schwer, verdient aber nachweislich mehr Aufmerksamkeit in der medizinischen Praxis. Unser kürzlich entwickelter Test für diese Bakterien kann dabei als wertvolles Werkzeug dienen.

Die hohe Rate an SDSE-Infektionen ist alarmierend, denn sie verursachen rheumatische Herzerkrankungen. Ursache sind SDSE-Stämme, die Kollagen über PARF (peptide associated with rheumatic fever) binden. Die Häufigkeit solcher Stämme und der rheumatischen Herzkrankheit in Südindien weisen auf eine entscheidende Rolle dieses Pathomechanismus hin.

Endothel-Interaktionen Invasive Infektionen sind häufig mit einer Verbreitung der Bakterien über die Blutbahn verbunden. Dort sind sie der Immunabwehr ausgesetzt. Um dieser zu entgehen, dringt *S. pyogenes* in die innere Zellschicht der Blutbahn (Endothel) ein. Dazu lösen die Bakterien einen Phagozytose-ähnlichen Prozess aus. Wir konnten zeigen, dass das Protein SpyCep daran beteiligt ist (Abb. 2). Dieser Faktor wird auch deshalb mit invasiven Infektionen in Verbindung gebracht, weil er den Botenstoff IL-8 abbaut und auch so der Immunabwehr entgegenwirkt.



Invasion von SpyCep-tragendem *S. pyogenes* (links) und SpyCep-gekoppeltem Latexpartikel (rechts) in humane Endothelzellen Foto: HZI, Rohde

Pneumokokken verursachen schwere Lungenentzündungen und beeinflussen das Genexpressionsprofil der Lungenendothelzellen, wie wir mit Hilfe eines Humangenom-Microarrays feststellen konnten. Phosphoglyceratkinase, ein zytoplasmatisches Enzym der Pneumokokken, das auch auf ihrer Oberfläche vorkommt, wurde außerdem als Plasminogenbinder identifiziert.

Zusammenfassend bietet die Aufklärung der Interaktionen von Streptokokken mit humanem Endothel und Plasminogen neue Ansätze für Therapien, die invasiven Infektionen entgegenwirken. Die Untersuchung vernachlässigter Streptokokkenpathogene erweitert den Blick auf die Schlüsselmechanismen der Streptokokkeninfektionen und gibt neue Anregungen für deren Diagnostik und Behandlung.

Bergmann, R, Dinkla, K, Nitsche-Schmitz, DP, Graham, RM, Lüttge, M, Sanderson-Smith, M, Nerlich, A, Rohde, M, Chhatwal, GS (2010) Biological functions of GCS3, a novel plasminogen binding protein of *Streptococcus dysgalactiae* ssp. *equisimilis*. *International Journal of Medical Microbiology*. doi:10.1016/j.ijmm.2010.06.007

Itzek A, Gillen CM, Fulde M, Friedrichs C, Rodloff AC, Chhatwal GS, Nitsche-Schmitz DP (2010) Contribution of plasminogen activation towards the pathogenic potential of oral streptococci. *PLoS One* 5: e13826



01.3 Molekulare Mechanismen des intrazellulären Transports, des Überlebens und der Persistenz von Streptokokken

PROJEKTLEITER | Priv.-Doz. Dr. Manfred Rohde | Abteilung für Medizinische Mikrobiologie | mro@helmholtz-hzi.de

PROJEKTMITARBEITER | Katja Branitzki-Heinemann

Streptococcus pyogenes, ein Gruppe A-Streptococcus (GAS), ist der Hauptverursacher von Streptokokken-Infektionen beim Menschen. Diese reichen von leichten bis zu schweren, sogar lebensbedrohlichen Infektionen, wie z.B. der nekrotisierenden Fasziitis. Streptokokken können auch rezidivierende Infektionen, wie z.B. Erysipel und Tonsillitis, verursachen. Dieses Phänomen wird als „carrier-Status“ der Streptokokkeninfektion beschrieben. Es ermöglicht, dass GAS nicht nur intrazellulär überleben kann, sondern auch einer längeren Antibiotikabehandlung widerstehen kann. Die Untersuchung des „carrier-Status“ der Streptokokken wurde in der Vergangenheit mehr oder weniger vernachlässigt. Über die beteiligten Mechanismen und Faktoren ist nicht viel bekannt.

Invasions- und Überlebensmechanismen der Streptokokken

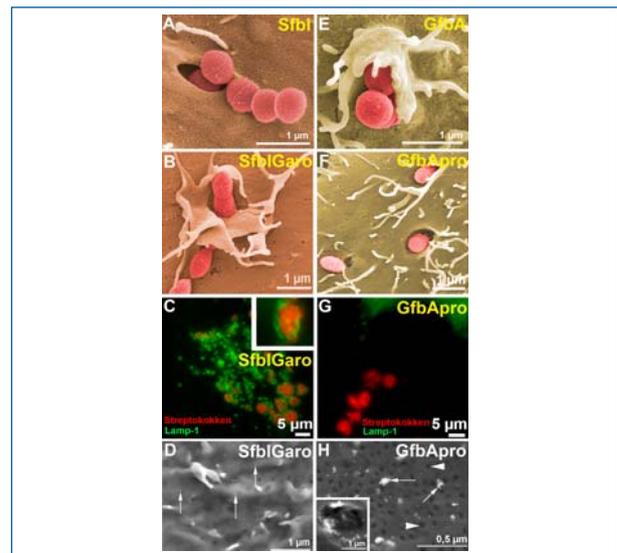
Es konnte nachgewiesen werden, dass die Fibronectin-bindenden Proteine der Streptokokken eine wichtige Rolle bei der Adhäsion und Invasion spielen. Das Streptokokken-Fibronectin-Bindungsprotein (SfbI) aus Gruppe A-Streptokokken vermittelt eine Adhäsion und Invasion durch Einstülpungen der Membran (A) in die Wirtszelle. Beteiligt sind Caveolae, und die Streptokokken verbleiben in einem Kompartiment, welches als Caveosom bezeichnet wird. SfbI benutzt dazu Fibronectin als Brückenmolekül zur Bindung an $\alpha_5\beta_1$ -Integrine. Durch die Nutzung dieses Caveolae-vermittelten Weges umgehen die SfbI-tragenden Streptokokken den lysosomalen Abwehrmechanismus der Wirtszelle, da es zu keiner Fusion mit Lysosomen kommt.

Gruppe C-Streptokokken exprimieren das Protein GfbA an der Oberfläche, das ebenfalls Fibronectin bindet und dann mit den $\alpha_5\beta_1$ -Integrinen interagiert. Jedoch zeigen invadierende Streptokokken das sogenannte „membrane ruffling“. Das sind Umlagerungen des Wirtszellzytoskeletts, obwohl ähnliche Mengen Fibronectin wie bei den SfbI-tragenden Stämmen gebunden werden (E). Die GfbA-exprimierenden Streptokokken folgen dem klassischen, endozytischen Weg mit der Fusion von Phagosom mit dem Lysosom. Die heterologe Oberflächenexpression des GfbA-Proteins in dem nicht pathogenen *S. gordonii* Stamm hat gezeigt, dass allein GfbA für den andersartigen morphologischen Invasionsmechanismus verantwortlich ist. Die Sequenzierung der GfbA-Gene zeigt, dass nur der C-terminale Teil eine starke Ähnlichkeit mit SfbI aufweist, während der N-terminale Bereich nur zu 60% ähnlich ist.

Herstellung von chimären SfbI- und GfbA-Proteinen

Anhand der Sequenzierdaten wurde die aromatische Domäne im N-terminalen Bereich als Vermittler des anderen Invasionsweges vermutet. Deshalb wurde einerseits ein GfbA-Protein ohne die aromatische Domäne hergestellt (GfbApro). Andererseits wurde die aromatische Domäne im SfbI-Protein durch die aromatische Domäne von GfbA ersetzt (SfbIGaro). Die GfbApro vermittelte Invasion zeigte nun wieder die

typische Caveolae-vermittelte Invasion (F) ohne Fusion mit den Lysosomen (G). Die SfbIGaro vermittelte Invasion zeigte dagegen nun „membrane ruffling“ (B) mit Lysosomenverschmelzung (C). Mit Hilfe von SfbIGaro-Goldnanopartikeln konnten wir nachweisen, dass die SfbIGaro-vermittelte Bindung an Fibronectin, wie ebenfalls die GfbA-vermittelte, nicht zu einer Integrin-Klusterbildung führt (D). Die GfbApro vermittelte Bindung jedoch schon (H). Damit wurde erstmalig in einem Fibronectin-bindenden Protein eine biologische Funktion der aromatischen Domäne gezeigt. Weiterhin gibt es erste Hinweise darauf, dass Streptokokken, die mit „membrane ruffling“ invadieren, immer mit den Lysosomen zu einem Phagolysosom fusionieren.



A) SfbI-exprimierende Streptokokken dringen in Wirtszellen durch die Ausbildung von Einstülpungen der Wirtszellmembran ein. E) GfbA-exprimierende Streptokokken invadieren in Wirtszellen über die Ausbildung von „membrane ruffle“, Umlagerungen des Zytoskeletts der Wirtszelle. B) heterologe Expression von SfbI mit der aromatischen Domäne von GfbA (SfbIGaro) auf der Zelloberfläche von *S. gordonii* führt ebenfalls zu einer Invasion über „membrane ruffle“ und einer nachfolgenden intrazellulären Fusion mit Lysosomen; Streptokokken sind rot eingefärbt, während Lysosomen mit Lamp-1 grün gekennzeichnet sind (C). F) die Deletion der aromatischen Domäne in GfbA (GfbApro) führt zu einer Invasion über Einstülpungen wie für SfbI beschrieben und es erfolgt keine Fusion mit den Lysosomen (G). D) die Bindung von SfbIGaro über Fibronectin an Integrine führt zu keinem Integrin-clustering, nur einzelne Goldpartikel sind detektierbar (Pfeile), wohingegen GfbApro ein Integrin-clustering aufweist, große Goldaggregate (H, Pfeile). Fotos: HZI, Rohde

01.4 Analyse der Proteinnetzwerke früher Wirt-Pathogen-Interaktionen

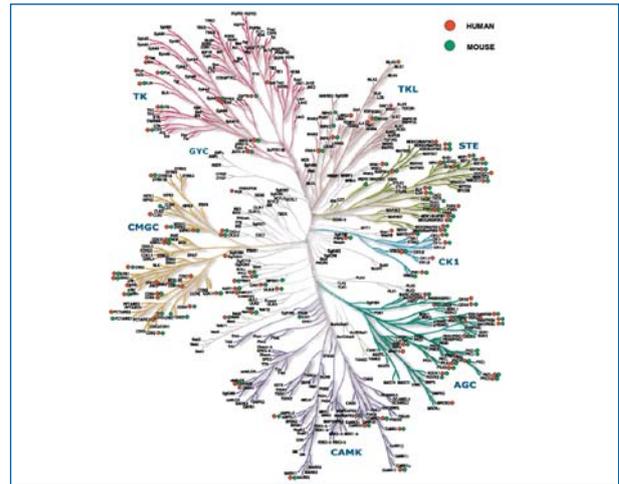
PROJEKTLEITER | Dr. Lothar Jänsch | Arbeitsgruppe Zelluläre Proteomforschung | lja@helmholtz-hzi.de

PROJEKTMITARBEITER | Dr. Uwe Kärst | Dr. Sebastian König | Dr. Manfred Nimtz | Dr. Tobias Reinl | Dr. Josef Wissing | Evelin Berger | Susanne Freund | Christoph Gernert | Alexander Iphöfer | Thorsten Johl | Kirstin Jurrat | Zofia Magnowska | Maxi Scheiter

Fokus der Arbeitsgruppe Zelluläre Proteomforschung ist die Analyse fundamentaler Signaltransduktionseignisse, die für humanpathogene Infektionsprozesse sowie die Aktivierung und Kontrolle der adaptiven Immunantwort des Wirtes wichtig sind. Zellbiologische, biochemische, massenspektrometrische und bioinformatische Arbeitsmodule werden hierfür entwickelt und kombiniert. Das Ziel: Eine quantitative und zeitaufgelöste Analyse der Expression, Lokalisation, Interaktion und der posttranslationalen Modifikationen (PTM) von Proteinen in primären und immortalisierten humanen Zellen.

Methoden Quantitative und chemische Proteomanalysen erlauben die Identifizierung zellulärer „Targetproteine“ und die Aufklärung von Signalnetzwerken. Hierzu werden niedermolekulare Moleküle aus der therapeutischen Wirkstoffforschung optimiert und nach einer Immobilisierung als „Fallen“ für Bindungspartner genutzt. In Kombination mit Chromatographie- und MS-Verfahren können wir transiente Strukturmodifikationen an Signalkomponenten aufklären. So werden im Fall der Phosphorylierung an Proteinkinasen sowohl deren Aktivitäten als auch die molekularen Interaktionen mit ihren Substratmolekülen koordiniert. Die statistische Auswertung quantitativer Peptiddaten erfolgt mit der iTRAQ™-Technologie. Dadurch können wir auch Prozesse in primären humanen Zellen und Geweben quantitativ beobachten.

Phosphorylierungsabhängige Signalwege im Invasionsprozess von *Listeria monocytogenes* Das Bakterium *L. monocytogenes* verursacht in immunkompromittierten Patienten schwere Erkrankungen sowie vorgeburtliche Infektionen. Die Virulenzfaktoren InlA und InlB induzieren durch Wechselwirkung mit dem Adhäsionsprotein E-Cadherin (InlA) und der Rezeptor-Tyrosinkinase c-Met (InlB) die Invasion der Wirtszelle. Die Signalübertragungswege werden durch Kinase-katalysierte Proteinphosphorylierungen kontrolliert. Durch die Identifizierung und Quantifizierung InlA-abhängiger, phosphorylierter Substratproteine haben wir ein funktionelles Netzwerk von Proteinkinasen im E-Cadherin-Signalweg abgeleitet. Eine direkte Analyse zeitaufgelöster Phosphorylierungsvorgänge an Kinasen konnte weltweit erstmalig am InlB-aktivierten c-Met-Signalweg demonstriert werden. Dabei wurden neue Signalkomponenten der listeriellen Invasion entdeckt, die auch in dem durch HGF kontrollierten physiologischen Met-Signalweg bisher nicht beschrieben wurden. Funktionelle Studien dieser Kinasen analysieren daher sowohl ihren Beitrag zur Invasion als auch ihre Bedeutung für motogene und



„Kinasebaum“ aller humanen Kinasen, markiert sind die aktuell identifizierten humanen Kinasen (rot) und deren Orthologe in der Maus. Grafik: HZI

mitogene zelluläre Prozesse. Die entwickelten Verfahren sind auf andere Proteinmodifikationen übertragbar und werden bereits für die Analyse von Ubiquitylierungen genutzt.

Charakterisierung von Signaltransduktionswegen in aktivierten NK- und T-Zellen T-Lymphozyten sind essenziell für die Regulation des Immunsystems. Ihre zellulären Prozesse und Effektorfunktionen sind dabei unmittelbar vom Aktivierungsstatus der Signalwege abhängig. Quantitative Phosphokinom-Analysen an verschiedenen regulatorischen T-Zellen zeigten neue Komponenten der CD3/CD28-abhängigen Signalwege auf. Beim Vergleich von CD3/CD28-induzierten Signalnetzwerken von effektorischen und regulatorischen T-Zellen wurden Expression und Phosphorylierungsstatus von etwa 150 Kinasen untersucht. Es wurden neue Signalkomponenten und Phosphorylierungsstellen in regulatorischen T-Zellen identifiziert. Sie werden nun hinsichtlich ihrer Rolle zur Bildung und Funktion suppressorischer T-Zellen in Mensch und Maus untersucht. Die an T-Zellen entwickelten Konzepte werden erstmalig auch zur Charakterisierung aktivierter NK-(natural killer) Zellen der angeborenen Immunantwort eingesetzt.

Hemmen, K. Reinl, T.; Buttler, K. Behler, F., Dieken, H. Jaensch, L., Wilting, J., Weich, H.A. (2010) High-resolution mass spectrometric analysis of the secretome from mouse lung endothelial progenitor cells. *Angiogenesis*, in press

Reinl T., Nimtz, M., Hundertmark, C., Johl, T., Kéri, G., Wehland, J., Daub, H. and Jänsch, L. (2009) Quantitative phosphokinome analysis of the Met pathway activated by the invasin InlB from *Listeria monocytogenes*. *Molecular Cell Proteomics* 8(12):2778-95.



01.5 Strukturelle und mechanistische Analyse funktioneller Amyloide

PROJEKTLITERIN | Prof. Dr. Christiane Ritter | Nachwuchgruppe Makromolekulare Interaktionen | cri07@helmholtz-hzi.de

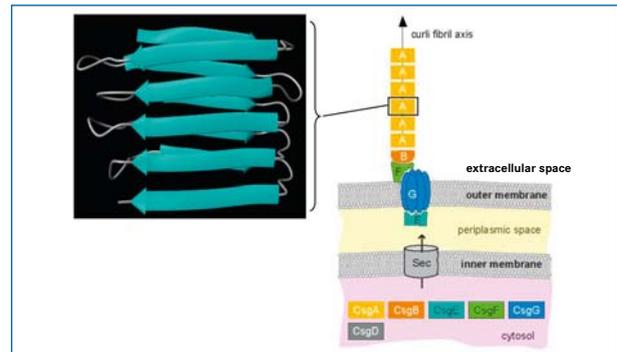
PROJEKTMITARBEITER | Agnes Zimmer | Madhu Nagaraj | Johannes Spehr | Tobias Schubeis

Amyloide sind geordnete Proteinfasern (sog. Fibrillen), die sowohl mit schweren Krankheiten – durch Proteinfehlfaltung ausgelöst –, als auch mit nützlichen Zellfunktionen zusammenhängen. In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass viele Bakterien fibrilläre Adhäsine ausbilden, die eine Amyloid-ähnliche Struktur ausbilden. In natürlich vorkommenden bakteriellen Biofilmen wiesen bis zu 40 % der anwesenden Spezies solche Strukturen auf. Einige von ihnen erhöhen die Virulenz der Bakterien, indem sie z.B. für die Ausbildung von Biofilmen wichtig sind, Interaktionen mit dem Wirt vermitteln oder die Adaptation an verschiedene Umweltbedingungen erleichtern. Im Gegensatz zu Amyloiden, die mit Krankheiten wie Alzheimer, Parkinson oder den Prion-Erkrankungen assoziiert sind, sind diese funktionalen Amyloide jedoch nicht toxisch.

Der Schwerpunkt unserer Forschung liegt auf der Aufklärung der strukturellen und mechanistischen Grundlage dieser Funktionen für ausgewählte bakterielle und pilzliche Amyloide.

Instrumente zur Bestimmung der Struktur von Amyloidfibrillen Hochauflösende, strukturelle Informationen über natürlich vorkommende Amyloide sind rar, da aufgrund ihrer Größe und nichtkristallinen Struktur etablierte Strukturanalysetechniken nur eingeschränkt nutzbar sind. Daher haben wir eine neue, allgemein anwendbare Methode erarbeitet, bei der die Struktur der Amyloidfibrillen über Kernmagnetresonanz (NMR)-detektierten Wasserstoffaustausch, Festkörper-NMR und weitere spektroskopische Techniken ermittelt werden kann. Festkörper-NMR ist eine neue Methode zur Bestimmung hochaufgelöster Proteinstrukturen mit hohem Potential für fibrilläre Proteine. Wir etablieren diese Methode am HZI und entwickeln biochemische Ansätze zur selektiven Isotopenmarkierung der Proteinproben.

Curli: eine Virulenz-verstärkende Amyloidhülle Curli ist die wichtigste Proteinkomponente der extrazellulären Matrix, die *Enterobacteriaceae*, wie z.B. *E. coli* und *Salmonella typhimurium*, produzieren. Curli-Fibrillen sind an der Adhäsion an biotischen und abiotischen Oberflächen und an der Bildung von Biofilmen beteiligt. Ihre Interaktion mit spezifischen Wirtsproteinen ermöglicht das Eindringen der Bakterien in die Wirtszellen und führt zu Entzündungen und Sepsis. *In vivo* wird die Fibrillenbildung der Hauptkomponente von Curli, CsgA, exklusiv durch das homologe Protein CsgB initiiert. Um die Funktionalitäten von CsgA und CsgB zu verstehen, analysieren wir die Strukturen, die Kinetik der Fibrillenbildung und die thermodynamische Stabilität der von beiden Proteinen gebildeten Fibrillen. Außerdem untersuchen wir die Struktur und Funktion von Proteinen,



Modell der Curli-Biogenese. Die Expression der Curli-Untereinheiten wird durch den positiven Transkriptionsregulator CsgD kontrolliert. CsgA ist die strukturelle Hauptkomponente. Um Curli-Fasern bilden zu können, benötigt es das homologe Protein CsgB als Nukleator. CsgG ist ein Membrankanal, der für den Export der Strukturproteine notwendig ist, und CsgE und CsgF sind molekulare Chaperone, die für die korrekte Ausbildung der Curli-Fasern notwendig sind. Die Vergrößerung zeigt ein Modell eines einzelnen CsgA Moleküls innerhalb der fibrillären Curli-Struktur, das basierend auf Wasserstoffaustauschdaten berechnet wurde.

die *in vivo* für die Biogenese von Curli-Fimbrien essenziell sind. Ein mechanistisches Verständnis der Curli-Biogenese wird es erlauben, neue Ansatzpunkte zu identifizieren, um die Ausbildung dieser Strukturen zu verhindern und so die Virulenz der Bakterien zu reduzieren.

HET-s: ein funktionelles Prion aus Fadenpilzen Einige der heute bekannten Amyloide sind in der Lage, sich *in vivo* selbst zu replizieren und sind somit Prionen (infektiöse Proteine). Um die molekularen Grundlagen für die Infektiosität von Amyloiden zu verstehen, untersuchen wir die biophysikalischen Eigenschaften des funktionellen Prionproteins HET-s aus dem Fadenpilz *Podospora anserina*, sowie die Eigenschaften eines homologen Proteins aus *Fusarium graminearum*. Trotz erheblicher Unterschiede in der Aminosäuresequenz sind die Amyloide der beiden Proteine für den jeweils anderen Organismus infektiös, d.h. es besteht keine Speziesbarriere. Mit Hilfe von Wasserstoffaustauschexperimenten konnten wir zeigen, dass dieses Verhalten auf einer hochkonservierten Struktur der Fibrillen beruht.

Wasmer, C., Zimmer, A., Sabate, R., Soragni, A., Saupe, S.J., Ritter, C., and Meier, B.H. (2010). Structural Similarity between the Prion Domain of HET-s and a Homologue Can Explain Amyloid Cross-Seeding in Spite of Limited Sequence Identity. *Journal of Molecular Biology* 402(2): 311-325.

Greenwald, J., Buhtz, C., Ritter, C., Kwiatkowski, W., Choe, S., Maddelein, M.L., Ness, F., Cescau, S., Soragni, A., Leitz, D., Saupe, S.J., and Riek, R. (2010). The Mechanism of prion inhibition by HET-S. *Molecular Cell* 38: 889-899.

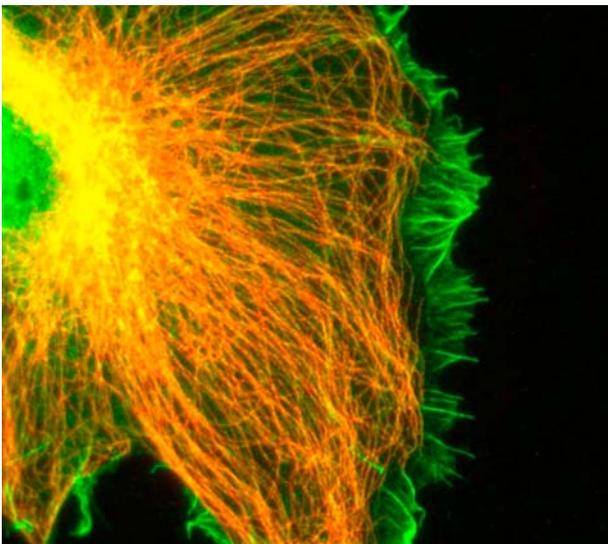
01.6 Dynamik von Mikrotubuli und bakterielle Pathogenese

PROJEKTLEITER | Prof. Dr. Jürgen Wehland (†) | Abteilung für Zellbiologie

PROJEKTMITARBEITER | Dr. Marco van Ham (mvh06@helmholtz-hzi.de) | Dr. Andreas Fischer | Dr. Marcin Ura | Ramona Baier

Während die Ausnutzung des Aktinsystems durch pathogene Bakterien bereits detailliert untersucht wurde, ist derzeit nur wenig über die Rolle des dynamischen Mikrotubulsystems in der bakteriellen Pathogenität bekannt. Mikrotubuli sind essenziell für eine Reihe von Funktionen eukaryotischer Zellen: Zellteilung, intrazellulärer Transport von Organellen und Vesikeln und verschiedene Formen zellulärer Motilität. Während der letzten Jahre haben wir uns auf die Analyse der Wirkung spezifischer post-translationaler Modifikationen von Tubulin auf spezifische zelluläre Funktionen konzentriert. Ein einzigartiges Enzym, die Tubulin-Tyrosin-Ligase (TTL), verantwortlich für die terminale Tyrosinierung von Tubulin, ist dank erheblicher Beiträge aus diesem Labor nun gut charakterisiert und der beschriebene Tyrosinierungszyklus in eukaryotischen Zellen sehr hoch konserviert. Für die Untersuchung der physiologischen Bedeutung des Tyrosinierungszyklus haben wir zuletzt TTL-defiziente Mäuse hergestellt. Die Analyse dieser TTL-negativen Mäuse ergab eine starke Desorganisation der Gehirnstruktur mit einem Verlust von Zellen und der Kontrolle des gerichteten Wachstums von neuronalen Fortsätzen, die im Ergebnis zum Tod der Mäuse kurz nach der Geburt führte. Damit wurde die essenzielle Rolle der TTL und damit des Tyrosinierungszyklus bewiesen.

TTL-negative Mäuse Konstitutiv TTL-negative Mäuse wurden durch konventionellen Gen-Knockout hergestellt. Neugeborene TTL-negative Mäuse waren von ihren Wildtyp-



Ein sich bewegendes embryonales Maus-Fibroblast, immungefärbt für das Mikrotubuli-Netzwerk (rot) und Aktin-reiche Strukturen im Lamellipodium (grün). Foto: HZI

Wurfgeschwistern äußerlich nicht zu unterscheiden, zeigten aber gestörte Atmung und Ataxie und starben innerhalb von 24 Stunden nach der Geburt. Die Ursache waren komplexe Gehirndefekte, wie Störungen der Balance des Wachstums bzw. der Differenzierung von Neuronen und defekte Kontrolle des Wachstums und der Differenzierung von Axonen. Unsere Ergebnisse belegen, dass innerhalb der Zelle der Tubulin-Tyrosinierungszyklus die Wechselwirkungen von Tubulin mit Proteinen reguliert, deren CAP-Gly-Domäne das Plus-Ende von Tubulin bindet. Diese Beobachtung erklärt auch die Beteiligung der TTL an der Etablierung der Zellpolarität.

Bedingter TTL-Knockout in Mäusen Da der konstitutive TTL-Knockout zum Tod kurz nach der Geburt führt blieb unklar, ob das Fehlen der TTL auch andere physiologische Aktivitäten außerhalb des Gehirns stört und auch erwachsene Mäuse beeinträchtigt. Um dies untersuchen zu können, haben wir kürzlich mit dem *cre/lox*-System bedingte Knockout-Mäuse hergestellt. Erste Ergebnisse zeigten eine Zelltyp-spezifische Deletion des TTL-Gens, die eine erhöhte Menge an detyrosiniertem Tubulin verursachte. Derzeit sind wir dabei, die TTL-negativen Mauslinien zu expandieren, um den oben beschriebenen Phänotyp der gestörten Gehirnentwicklung näher zu untersuchen. Darüberhinaus werden wir den Einfluss des TTL-Zyklus in verschiedenen blutbildenden Zelllinien untersuchen.

Aussicht Unser Ziel ist ein detailliertes Verständnis des Tubulin-Tyrosinierungszyklus. Dies beinhaltet auch die Aufklärung der Funktion spezifischer Tubulin-bindender Proteine (z.B. CLIPs) in der Regulation der Tubulin-Dynamik auf der Grundlage der TTL-Knockouts. Diese Untersuchungen werden *in vivo* und *in vitro* sowohl anhand der bedingten TTL-Knockout-Mäuse als auch in Gewebekultur verfolgt, mit den Schwerpunkten Zelladhäsion und -polarität. Von besonderem Interesse ist darüber hinaus die zentrale offene Frage der Zytoskelett-Forschung: wie interagieren Mikrotubuli mit dem Aktinzytoskelett? Wie funktioniert die Kommunikation zwischen beiden Zytoskelett-bildenden Systemen? Ein weiteres besonders wichtiges Thema ist die Frage, wie bakterielle und virale Krankheitserreger das Mikrotubuli-System zum eigenen Vorteil ausnutzen können, indem sie spezifische Wirtszell-Signalwege manipulieren. Und wie beeinflussen Krankheitserreger die Wechselwirkungen zwischen dem Aktin- und dem Tubulinsystem?

Schwan, C., Stecher, B., Tzivelekidis, T., van Ham, M., Rohde, M., Hardt, W.D., Wehland, J., Aktories, K. (2009) Clostridium difficile toxin CDT induces formation of microtubule-based protrusions and increases adherence of bacteria. *PLoS Pathogens* 5, e1000626.

Erck, C., Peris, L., Andrieux, A., Meissirel, C., Gruber, A.D., Vernet, M., Schweitzer, A., Saoudi, Y., Pointu, H., Bosc, C., Salin, P.A., Job, D., Wehland, J. (2005) A vital role of tubulin-tyrosine-ligase for neuronal organization. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 102, 7853-7858.



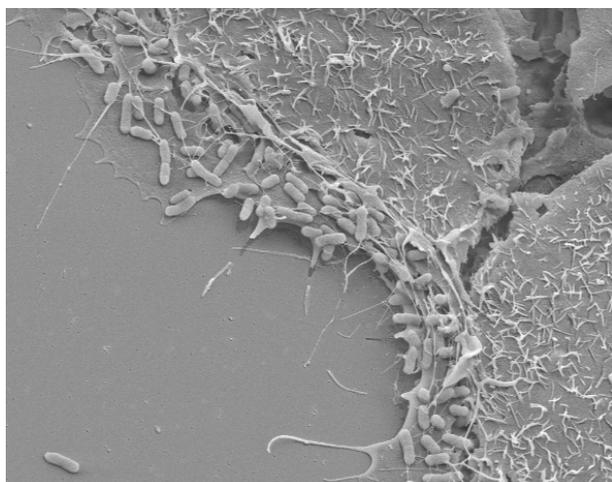
01.7 Funktion und Regulation von *Yersinia* Virulenzfaktoren

PROJEKTLEITER | Prof. Dr. Petra Dersch | Abteilung für Molekulare Infektionsbiologie | pde08@helmholtz-hzi.de

PROJEKTMITARBEITER | Katja Böhme | Katharina Herbst | Dr. AnnKathrin Heroven | Dr. Annika Kochhut | Wiebke Opitz | Dr. Fabio Pisano | Rebekka Steinmann | Tatjana Stolz | Tanja Thiermann | Frank Uliczka

Enteropathogene *Yersinien* lösen ein weites Spektrum von Darm-assoziierten Erkrankungen, wie Diarrhö, akute Enteritis, Colitis und mesenteriale Lymphadenitis aus. Diese Krankheiten werden als Yersiniosen bezeichnet und können reaktive Arthritis nach sich ziehen. *Yersinien* sind weit verbreitet und werden auf den Menschen hauptsächlich über kontaminiertes Schweinefleisch übertragen. Diese Bakterien haben spezielle Oberflächenstrukturen evolviert, mit denen sie sich fest an Wirtszellen binden und in diese aktiv einwandern können. Diese Außenmembranproteine – Adhäsine und Invasine – ermitteln die Bindung an bestimmte Wirtszellrezeptoren, wodurch spezielle Signaltransduktionswege im Inneren der Wirtszelle ausgelöst werden: Das Aktinzytoskelett lagert sich um und führt zur Formation von speziellen Membranausstülpungen. Diese umwandern die Bakterien und schließen sie in die Zelle ein. So überqueren die Bakterien das Darmepithel, wandern in darunter liegende lymphatische Gewebe ein und breiten sich in tiefer liegenden Organen aus. Wir charakterisieren die Funktion und Expression von *Yersinia* Invasionsfaktoren, um zu verstehen, wie diese Darmbakterien das Wirtsgewebe besiedeln und dabei das Immunsystem abwehren.

Molekulare Analyse der *Yersinia*-vermittelten Signaltransduktion in Epithelzellen Um die für die Einwanderung von *Y. pseudotuberculosis* essenziellen Signalmoleküle zu identifizieren, wurde die Wirtszellaufnahme durch die *Yersinia* Invasionsfaktoren YadA und Invasin studiert. Sie interagieren indirekt über extrazelluläre Matrixproteine oder direkt mit



Adhärente *Y. enterocolitica* auf menschlichen Epithelzellen

Foto: HZI, Rohde

den β -Integrinrezeptoren. Ko-Lokalisationsstudien und Aktivierungssassays haben gezeigt, dass die Proteinkinase B (Akt), Phospholipase C- γ und Varianten der Proteinkinase C an die Zellmembran unterhalb der gebundenen Bakterien rekrutieren und zeitabhängig aktiviert werden. Die Anwendung von Inhibitoren, „knock-out“ Zelllinien und RNA Interferenz hat zudem gezeigt, dass diese Faktoren nach der Aktivierung der Fokalen Adhäsionskinase (FAK), c-Src und der PI3 Kinase aktiviert werden und für die Internalisation der Bakterien essenziell sind. Desweiteren gibt es neue Hinweise darauf, dass neben der kleinen GTPase Rac-1 noch weitere GTPasen der Rho-Familie und Aktin-assoziierte Proteine, wie N-WASP und der Arp2/3 Komplex beteiligt sind. Weiterhin wurden zwei neu identifizierte Adhäsine von *Y. pseudotuberculosis* untersucht. Sie ähneln Invasin und vermitteln eine feste Bindung an Darmepithelzellen. Erste Analysen im Mausmodell zeigen, dass der Verlust eines dieser Faktoren das Überleben der Mäuse deutlich verlängert.

Temperatur-abhängige Expression von *Yersinia* Virulenzfaktoren Ein weiteres wichtiges Ziel ist, die Expression von *Yersinia* Virulenzgenen während der Infektion aufzuklären. Ein bedeutender Faktor ist der Temperaturwechsel, den die Bakterien beim Eintritt aus der Umwelt in den Wirt wahrnehmen. Die Expression des Invasins reguliert RovA. Wir konnten zeigen, dass dieses Regulatorprotein bei einer Temperaturveränderung von 30°C auf 37°C seine Konformation reversibel verändert. Damit kann es nicht mehr mit der DNA interagieren, nicht mehr die Synthese des Invasins kontrollieren, und es wird schneller durch die bakterielle Protease Lon abgebaut. Weiterhin wurden andere post-transkriptionale regulatorische Mechanismen analysiert. Diese regulatorischen Mechanismen werden vor allem dazu verwendet, um die Synthese von Virulenzfaktoren im Verlauf der Infektion genau auf die vorhandene Nahrung, Konkurrenz durch andere und Angriffe durch das wirtseigene Immunsystem einzustellen.

Herbst, K., Bujara, M., Heroven, A.K., Opitz, W., Weichert, M., Zimmermann, A., & Dersch, P. (2009) Intrinsic thermal sensing controls proteolysis of *Yersinia* virulence regulator RovA *PLoS Pathogens* 5(5):e1000435.

Uliczka, F., Kornprobst, T., Eitel, J., Schneider, D., & Dersch P. (2009) Cell invasion of *Yersinia pseudotuberculosis* by invasin and YadA requires protein kinase C, PLC- γ 1 and Akt kinase *Cellular Microbiology* 11, 1782–1801.

Heroven, A.K., Böhme, K., Rohde, M., & Dersch, P. (2008) A Csr regulatory system, including small non-coding RNAs, regulates the global virulence regulator RovA of *Yersinia pseudotuberculosis* through RovM *Molecular Microbiology* 68,1179-1195.



01.8 Strukturelle Charakterisierung von Faktoren der Pathogenabwehr

PROJEKTLEITER | Dr. Konrad Büssow | Arbeitsgruppe Rekombinante Proteinexpression | kbu07@helmholtz-hzi.de

PROJEKTMITARBEITER | Sonja Wilke | Sarah Tokarski

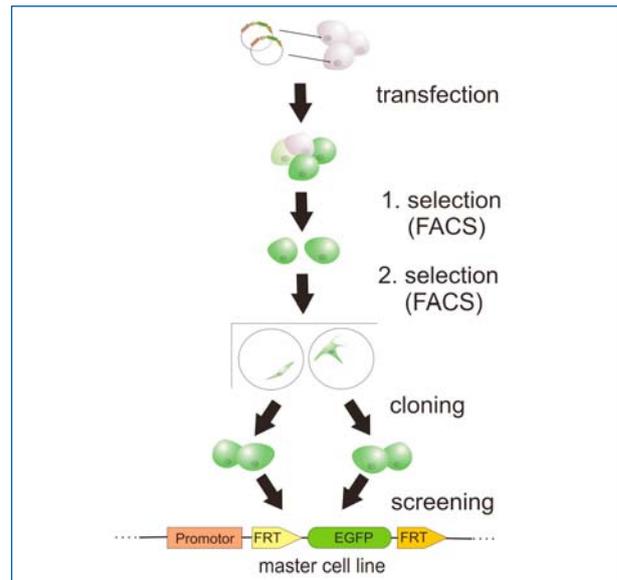
An der Abwehr von Krankheitserregern nimmt eine Vielzahl von Proteinen teil. Die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur von Proteinen durch Röntgenstrukturanalyse liefert wichtige Informationen über ihre Funktionsweise. Bei vielen menschlichen Proteinen waren Strukturuntersuchungen bisher nicht möglich, weil die Proteine nicht in größeren Mengen rein hergestellt werden konnten. Das ist jedoch die Voraussetzung, um Proteinkristalle zu züchten und Röntgenbeugungsdaten aufzunehmen.

Proteine werden für Röntgenstrukturanalysen meistens in Bakterien hergestellt. Die Bakterien werden gentechnisch so verändert, dass sie das jeweilige Zielprotein in großen Mengen produzieren. Das Verfahren ist schnell und preiswert. Allerdings lassen sich viele menschliche Proteine, die an der Abwehr von Krankheitserregern beteiligt sind, so nicht herstellen. In Bakterien werden die notwendigen Prozessierungsschritte nicht ausgeführt, die diese Proteine in ihre biologisch aktive Form überführen.

Proteine aus tierischen Zellkulturen Kultivierte tierische Zellen sind bei der Herstellung von Proteinen für die Röntgenstrukturanalyse eine Alternative zu Bakterien. Meistens werden Insektenzellen eingesetzt, die mit gentechnisch veränderten Baculoviren infiziert werden. Aber auch Säugerzelllinien leisten gute Dienste, besonders bei Proteinen, die in ihrer natürlichen Umgebung aus den Zellen ausgeschleust werden und sich in der extrazellulären Flüssigkeit oder auf der Zellaußenseite befinden.

Diese ausgeschleusten Proteine, beispielsweise Antikörper oder Zytokine, sind oftmals durch Disulfidbrücken stabilisiert und tragen Kohlenhydratketten auf ihrer Oberfläche. Um sie für die Röntgenstrukturanalyse herzustellen, bietet sich die Hamster-Zelllinie CHO-Lec 3.2.8.1 an. Bei ihr führen Mutationen dazu, dass die Kohlenhydratketten klein und einheitlich ausfallen und die produzierten Proteine deshalb gut kristallisierbar sind.

Beschleunigte Zelllinienherzeugung Nachteilig ist, dass die Herstellung einer gentechnisch veränderten CHO-Lec Zelllinie nach Standardmethoden ungefähr ein Jahr erfordert. Durch den Einsatz eines neuen Verfahrens konnten wir den Zeitaufwand stark reduzieren. Dieses Verfahren basiert auf einem fluoreszierenden Reportergen, GFP, das es ermöglicht, gentechnisch veränderte CHO-Lec Zellen mit besonders guten Produktionseigenschaften mit der Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung (FACS) zu separieren und anschließend zu klonieren.



Klonierung einer stabilen GFP Zelllinie durch Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung *Grafik: HZI*

Die Kassettenaustauschtechnologie (RMCE) ermöglicht es, die Herstellung von Produktionszelllinien noch weiter zu beschleunigen. RMCE erlaubt es, über ortsgerichtete Rekombination ein Markergen wie GFP gegen ein beliebiges anderes Gen auszutauschen. Ein Verfahren, das nur wenige Wochen in Anspruch nimmt. Wir haben die Klonierung einer GFP-Zelllinie über Zellsortierung mit RMCE kombiniert und konnten den Kassettenaustausch in CHO-Lec Zellen bereits erfolgreich demonstrieren.

Mit dieser Methode haben wir Produktionszelllinien für verschiedene Lysosomen-assoziierte Membranproteine (LAMP) hergestellt. Die Zelllinien sekretieren verkürzte LAMP Proteine, denen der Membrananker fehlt. Die LAMPs spielen in den Lysosomen eine wichtige Rolle und sind für Beseitigung von Krankheitserregern durch Phagozytose erforderlich. Verschiedene LAMP Proteine konnten in großen Mengen hergestellt und kristallisiert werden. Zum ersten Mal konnte die räumliche Struktur eines LAMPs ermittelt werden. Allerdings sind weitere Arbeiten nötig, um die Struktur zu verbessern und den molekularen Aufbau dieser wichtigen Proteine im Detail zu verstehen.



01.9 Mykobakterielle Phagosomen und Immunität

PROJEKTLEITER | Dr. Maximiliano G. Gutierrez | Nachwuchsgruppe Phagosomen Biologie | mgg08@helmholtz-hzi.de

PROJEKTMITARBEITER | Achim Gronow | Bahram Kasmapour | Gang Pei | Dr. Cristina Vazquez

M. tuberculosis ist so erfolgreich, weil es in der Lage ist, innerhalb der Phagosomen von Makrophagen zu überleben. *M. tuberculosis* blockiert die Phagosomreifung, insbesondere die Phase, in der Phagosom und Lysosom fusionieren. Dadurch kann es in den Makrophagen wachsen und trägt zur Ausbildung des pathologischen Zustands bei. Die Mechanismen hinter der blockierten Phagosomreifung durch *M. tuberculosis* sind noch unklar. Vermutlich wird die Art der Manipulation der intrazellulären Abwehrreaktion durch das Mykobakterium von mehreren Faktoren gesteuert und erfolgt dynamisch. Es wurden verschiedene intrazelluläre Angriffspunkte, wie etwa die Rab-Proteine, in Betracht gezogen. Sie könnten die Blockierung der bakteriziden Funktion einer infizierten Makrophage erklären. Das zeigt, dass der Eingriff in den intrazellulären Stoffaustausch ein wesentlicher Bestandteil der Überlebensstrategie dieses Pathogens ist.

Für die Vernichtung von intrazellulären Mykobakterien durch die Makrophagen ist die NF- κ B-Aktivierung erforderlich (Gutierrez et al., 2008). Wichtiger ist jedoch, dass die Blockade der NF- κ B-Aktivierung die Fusion zwischen mykobakteriellen Phagosomen und Lysosomen verlangsamt. Über Mikroarray-Analyse des gesamten Genoms konnten wir einige interessante Kandidaten ermitteln.

Die aussichtsreichsten Kandidaten sind dabei Rab34, Rab20 und Sortilin. Obwohl die Funktion dieser Proteine bei der Phagosomreifung noch nicht bekannt ist, war die erste Aufgabe, die Proteinfunktion in Verbindung mit der Phagosomreifung zu charakterisieren. Auf dieser Basis können wir dann das intrazelluläre Verhalten dieser Proteine während einer mykobakteriellen Infektion von Makrophagen besser verstehen.

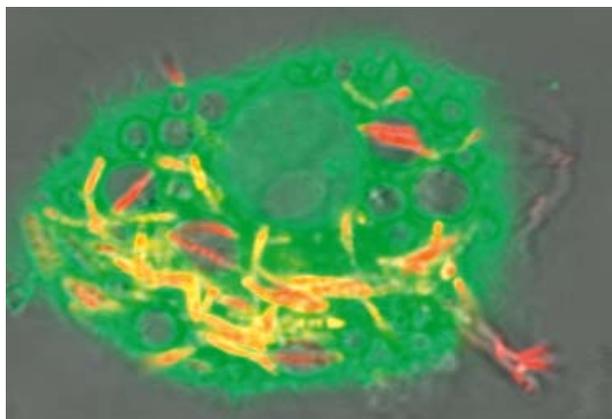


Abb. 1. RAW 264.7-Makrophagen, die Rab20-GFP (grün) exprimieren und eine starke Infizierung mit Mykobakterien (rot) aufweisen. Einige der Bakterien befinden sich in großen Rab20-GFP positiven Vakuolen. Foto: HZI, Gang Pei

Rab-GTPasen und Phagosomreifung Für das Protein Rab34 haben wir die polyklonalen Antikörper bestimmt und gezeigt, dass sich Rab34 größtenteils im Golgi-Apparat lokalisieren lässt. Lebendzellbeobachtung, Western-Blot-Analyse und elektronenmikroskopische Untersuchungen haben gezeigt, dass das Protein Rab34 mit den Phagosomen in Verbindung steht. Da dieses Rab-Protein wahrscheinlich an der Fusion zwischen Phagosomen und Lysosomen beteiligt ist, haben wir den Einfluss der Rab34-Mutanten auf die Akquisition von lysosomalen Markern durch Phagosomen untersucht. Unsere Daten zeigen, dass die Expression von konstitutiv aktiven Mutanten die Fusion zwischen Phagosomen und Lysosomen verstärkt.

Für den Test mit Rab20 haben wir Rab20 in pEGFP-C1 geklont und einen negativen Mutanten generiert, der nicht an GTP binden kann. Das Protein Rab20 steht mit dem Golgi-Apparat und großen Vesikelstrukturen in Verbindung, und vermutlich hat dieses Protein eine bestimmte Aufgabe bei der Makropinosom-Bildung. Zudem besteht ein Zusammenhang zwischen dem untersuchten Protein und den Latexkugelphagosomen in der Frühphase der Internalisierung. Bei der mykobakteriellen Infektion wurde das Protein Rab20-GFP in die mykobakteriellen Phagosomen eingebaut (Abb. 1), und wir untersuchen derzeit, ob dieses einen Einfluss auf die Phagosomreifung hat.

Zuordnung lysosomaler Enzyme zu Phagosomen Sortilin vermittelt den direkten Stofftransport lysosomaler Enzyme vom Golgi-Apparat zu den Latexkugelphagosomen – ein weiterer Transportweg für Proteine, um während der Phagosomreifung an den Lysosomen vorbei zu den Phagosomen transportiert zu werden (Wähe et al., 2010). Wir planen, den mykobakteriellen Stofftransport und die Vernichtung der Mykobakterien mit einem Sortilin-KO-Mausmodell zu untersuchen (in Zusammenarbeit mit Dr. A. Nykjaer, Aarhus, Dänemark). Desweiteren untersuchen wir, welche Aufgabe das Sortilin bei der mykobakteriellen Phagosomreifung hat. Wir werden verschiedene Mutanten des Sortilin einsetzen, die keine Signale an Adapterproteine, Endozytose oder Retromer-Interaktionen weitergeben.

Fabrino, D. L., Bleck, C. K., Anes, E., Hasilik, A., Melo, R. C., Niederweis, M., Griffiths, G., & Gutierrez, M. G. (2009) Porins facilitate nitric oxide-mediated killing of mycobacteria. *Microbes and Infection* 11, 868-875.

Gutierrez, M. G. & Griffiths, G. (2009) Phagosome-cytoskeleton interactions. In: *Intracellular Niches of Pathogens A Pathogens Guide through the Host Cell*, (Schaible, U.; Haas, A.) Wiley-VCH, Weinheim, Germany.

Wähe, A., Kasmapour, B., Schmaderer, C., Liebl, D., Sandhoff, K., Nykjaer, A., Griffiths, G., & Gutierrez, M. G. (2010) Sortilin mediates the transport of Acid Sphingomyelinase and Prosaposin from the Golgi to phagosomes. *Journal of Cell Science* 123, 2502-11 (Cover).

01.10 Molekulare Mechanismen der Wirtszell-Pathogen-Interaktionen

PROJEKTLEITER | Prof. Dr. Klemens Rottner | ehemalige Arbeitsgruppe Zytoskelett Dynamik | krottner@uni-bonn.de

PROJEKTMITARBEITER | Dr. Jennifer Block | Dr. Stefan Köstler | Markus Ladwein | Margit Oelkers | Dr. Malgorzata Szczodrak

Ziel dieses Projektes ist die genaue Untersuchung der molekularen Mechanismen, die den Aktinumbau im Verlauf von unterschiedlichen Motilitätsvorgängen sowie die Interaktionen verschiedener Pathogene mit ihren Wirtsorganismen steuern.

Die Aktinpolymerisation wird durch Proteinkomplexe katalysiert, die die Nukleation von Aktinfilamenten verstärken, wie z.B. der Arp2/3-Komplex oder die Familie der Formine. Zu den zentralen Aktinregulatoren gehören somit die Aktivatoren des Arp2/3-Komplexes, wie z.B. die Mitglieder der WASP- und WAVE-Familie, die in der Lage sind, unterhalb der Rho-GTPasen Cdc42 und Rac1 zu agieren. Zu den jüngeren Mitgliedern dieser Familie von Arp2/3-Komplex-Aktivatoren gehören die Proteine der WHAMM/JMY-Untergruppe und WASH (Rottner et al., 2010), wobei erst vor kurzem nachgewiesen werden konnte, dass das Letztere die Invasion von *Salmonella* fördert (Hänisch et al., 2010).

Das Src-Substrat Cortactin ist ein weiteres, zentrales Arp2/3-Komplex-bindendes Protein, das an dynamischen Aktin-Reorganisationsprozessen beteiligt ist, wie z.B. an der Ausbildung von Lamellipodien und möglicherweise anderen von Pathogenen ausgelösten Zelloberflächenveränderungen. Wir haben Zellen hergestellt und Mäuse gezüchtet, bei denen eine konditionale Mutation des Cortactin-Gens vorliegt. Zu unserer Überraschung stellte sich heraus, dass die gentechnische Entfernung von Cortactin in Fibroblasten nicht zur Ausschaltung der Arp2/3-Komplex-Aktivierung an der Zellperipherie oder von durch Rac1 ausgelöste Aktinpolymerisationsprozesse geführt hat. Die Deletion von Cortactin verursachte jedoch beispielsweise eine Beeinträchtigung der Signaltransduktion zur Aktivierung der kleinen GTPasen Rac und Cdc42, das heißt förderte eine Rolle bei „upstream“ und nicht „downstream“ dieser kleinen GTPasen zu Tage. Die Verringerung der Signalweiterleitung zur Aktinpolymerisation war beispielsweise nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren oder während der Zellmigration evident (Lai et al., 2009).

Diese Daten deckten sich auch mit kürzlich von uns publizierten Erkenntnissen, die wir aus der mikroskopischen Analyse des „turnovers“, also des Aktinumbaus in Lamellipodien gewinnen konnten. Zudem zeigen neuere Daten, dass Cortactin zum Unterschied anderer Arp2/3-Aktivatoren auch nicht in der Lage ist, ektopische Aktinpolymerisation im Zytoplasma zu vermitteln (Oelkers et al., eingereicht). Dies bestätigte einmal mehr, dass die Mehrzahl der Cortactin-Moleküle in

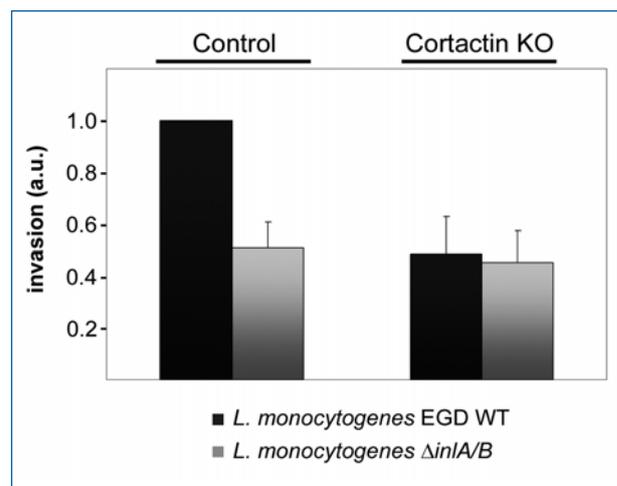


Abb. 1. Die InlB-vermittelte Invasion von *Listerien* ist abhängig von Cortactin, denn Cortactin-defiziente Zellen (Cortactin KO) können durch Wildtyp-*Listerien* (*L. monocytogenes* EGD WT, schwarz) gleichermaßen schlecht infiziert werden wie Internalin A/B-defiziente Bakterien (grau). Grafik: HZI

Lamellipodien nicht an der Arp2/3-Aktivierung an der lamellipodialen Spitze beteiligt sein können (Lai et al., 2008).

Schließlich haben wir in neueren Studien untersucht, welche Rolle Cortactin bei verschiedenen Pathogen-Wirtszell-Interaktionen spielt. Interessanterweise scheint Cortactin zwar für die InlB-vermittelte *Listerien*invasion essenziell zu sein, zum Unterschied zur aktuellen Literatur nicht jedoch für die durch *Shigella flexneri* stimulierte Invasion und auch nicht für die Ausbildung von Aktinpodesten, die von verschiedenen Stämmen von pathogenen *E. coli* auf der Zelloberfläche ausgelöst werden (Oelkers/Lai et al., unveröffentlicht).

Rottner, K., Hänisch, J., & Campellone, K. (2010) WASH, WHAMM and JMY: Regulation of Arp2/3 complex and beyond. *Trends in Cell Biology* 20(11), 650-61.

Hänisch, J., Ehinger, J., Ladwein, M., Rohde, M., Derivery, E., Bosse, T., Steffen, A., Bumann, D., Misselwitz, B., Hardt, W.-D., Gautreau, A., Stradal, T.E.B., & Rottner, K. (2010) Molecular dissection of *Salmonella*-induced membrane ruffling versus invasion. *Cellular Microbiology* 12(1), 84-98.

Lai, F.P.L., Szczodrak, M., Oelkers, J.M., Ladwein, M., Acconcia, F., Benesch, S., Auinger, S., Faix, J., Small, J.V., Polo, S., Stradal, T.E.B., & Rottner, K. (2009) Cortactin promotes migration and platelet-derived growth factor-induced actin reorganization by signaling to Rho-GTPases. *Molecular Biology of the Cell* 20(14), 3209-23.

Lai, F.P.L., Szczodrak, M., Block, J., Faix, J., Breitsprecher, D., Mannherz, H.G., Stradal, T.E.B., Dunn, G.A., Small, J.V., & Rottner, K. (2008) Arp2/3-complex interactions and actin network turnover in lamellipodia. *EMBO Journal* 27(7), 982-92.



01.11 Signalübertragung zur Steuerung der Aktindynamik

PROJEKTLEITER | Prof. Dr. Theresia E.B. Stradal | ehemalige Arbeitsgruppe Signaltransduktion und Motilität | theresia.stradal@uni-muenster.de

PROJEKTMITARBEITER | Stefan Arens | Jan Hänisch | Kathrin Schloen | Kai Schlüter

Die Manipulation des Aktinzytoskeletts durch pathogene Bakterien ist ein zentrales Thema bei der Untersuchung der bakteriellen Pathogenese. Das Aktinsystem wird umfunktioniert, um sich eine Nische für die Replikation zu schaffen, das Immunsystem zu umgehen, indem man sich im Inneren von nicht-phagozytischen Zellen verbirgt, oder um die Phagozytose von professionellen Abwehrzellen zu blockieren. Die Beeinflussung der Aktindynamik erfolgt entweder direkt über die Modifikation von Aktin, oder indirekt über Regulatoren, die die Aktindynamik steuern. Das sind häufig Mitglieder der Rho-Familie der kleinen GTPasen, die wichtige Funktionen bei der Regulation Aktin-abhängiger Prozesse in der angeborenen oder adaptiven Immunität haben. Rho-GTPasen dienen als molekulare Schalter, die während eines Aktivierungszyklus die Aktinfilamentbildung aktivieren bzw. herunterregulieren. Bakterielle Toxine können alle Phasen dieses Aktivierungszyklus beeinflussen. Die Deaktivierung von Rho-GTPasen wird von bakteriellen Effektoren mit GAP-ähnlichen Wirkungen bewerkstelligt (z.B. SptP von *Salmonella*), wohingegen die Aktivierung durch Faktoren mit GEF-Aktivität vermittelt wird (z.B. SopE von *Salmonella*; [1]). Eine neue Familie bakterieller Virulenzfaktoren, die als WxxxE-Familie bezeichnet wird, zeichnet sich durch bakterielle GEF-Aktivität aus. Sie weist Ähnlichkeit mit SopE auf, das strukturell auch mit einem GEF verwandt ist. Erst vor kurzem gelang es uns, die Interaktion zwischen dem WxxxE-Faktor IpgB2 von *Shigella flexneri* und dem menschlichen RhoA zu charakterisieren, die für die bakterielle GEF-Aktivität [2] von zentraler Bedeutung ist. Zurzeit arbeiten wir an der Erstellung von Interaktionsnetzwerken von bakteriellen und zellulären GEFs, GAPs und den zugehörigen kleinen GTPasen.

Ein Beispiel für eine direktere Manipulation der Aktinfilamentbildung sind pathogene *E. coli* vom Typ EPEC (enteropathogene *E. coli*) oder EHEC (enterohämorrhagische

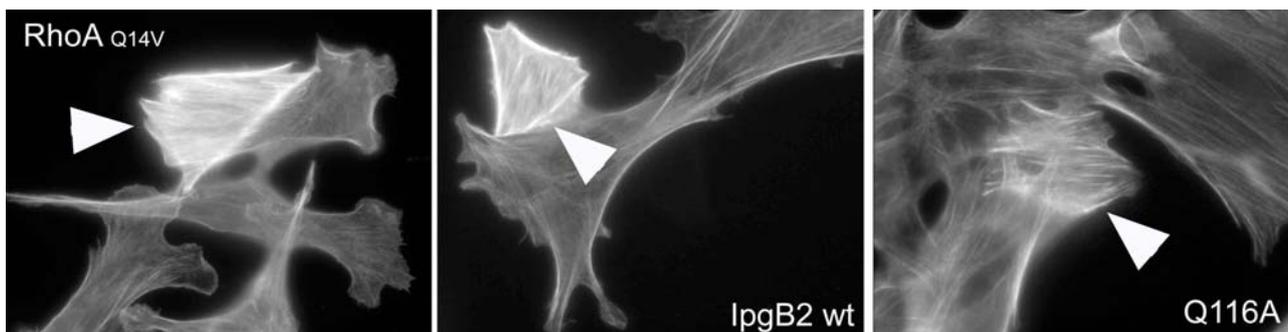
E. coli): Beide Stämme docken fest an die Oberfläche der Wirtszelle an und lösen Aktinpolymerisation direkt unter dem Bakterium aus. EPEC ahmen Rezeptortyrosinkinase-Signalwege nach, in einer Art und Weise, die dem Vorgehen von Pockenviren erschreckend ähnlich ist [3]. Die von EHEC ausgelöste Aktinfilamentbildung erfordert eine Translokation von zwei bakteriellen Proteinen, des Transmembranrezeptors Tir, der als Andockanker für die Bakterien dient, und des N-WASP-Bindungspartners und -aktivators der zellulären Aktinpolymerisationsmaschinerie: EspF_U/TccP. Da Tir nicht direkt an EspF_U bindet, müssen zusätzliche Faktoren als Brücke zwischen diesen beiden Komponenten fungieren. Um diesen Faktor zu identifizieren, haben wir durch EspF_U angereicherte Proteinkomplexe mittels Massenspektrometrie untersucht. Dabei fanden wir heraus, dass das Wirtszellprotein IRSp53 eine direkte Verbindung zwischen Tir und EspF_U herstellt. Weiterhin konnten wir zeigen, dass EspF_U und IRSp53 in den durch EHEC induzierten Aktinpodesten ko-lokalisieren und dass der Verlust der IRSp53-Funktion mit dem Verschwinden von Aktinpodesten einhergeht. IRSp53 stellt somit den fehlenden Wirtszellfaktor zwischen bakteriellem Tir und EspF_U dar [4]. Weiterführende Arbeiten beschäftigen sich mit den molekularen Interaktionen zwischen Wirtszell- und bakteriellen Faktoren, inklusive Analysen bis zur atomaren Ebene (Zusammenarbeit mit MOSB).

[1] Hänisch, J., Ehinger, J., Ladwein, M., Rohde, M., Derivery, E., Bosse, T., Steffen, A., Bumann, D., Misselwitz, B., Hardt, W.-D., Gautreau, A., Stradal, T.E.B., & Rottner, K. (2010) *Cellular Microbiology* **12**(1), 84-98.

[2] Klink, B.U., Barden, S., Heidler, T.V., Borchers, C., Ladwein, M., Stradal, T.E.B., Rottner, K., & Heinz, D.W.*. (2010) *Journal of Biological Chemistry* **285**, 17197-17208.

[3] Rottner, K. & Stradal, T.E.*. (2009) *Cell Host and Microbe* **6**, 497-499.

[4] Weiss, S.M., Ladwein, M., Schmidt, D., Ehinger, J., Lommel, S., Städtig, K., Beutling, U., Disanza, A., Frank, R., Jänsch, L., Scita, G., Gunzer, F., Rottner, K., & Stradal, T.E.*. (2009) *Cell Host and Microbe* **5**, 244-258.



Embryonale Mausfibroblasten, die konstitutiv aktives RhoA exprimieren, bakterielles IpgB2-Wildtyp oder die attenuierte IpgB2-Mutante Q116A (modifiziert aus Klink et al., 2010). Der Virulenzfaktor IpgB2 löst Effekte aus, die phänotypisch einer RhoA-Aktivierung entsprechen. Fotos: HZI



01.12 Erstellung und Nutzung der DNA-Sequenzdaten

PROJEKTLEITER | Dr. Helmut Blöcker | Abteilung für Genomanalyse | bloecker@helmholtz-hzi.de

PROJEKTMITARBEITER | Cyril Alozieuwa | Dr. Sabin Bhujy | Dr. Igor Deyneko | Ayssar Elamin | Michael Jarek | Yulia Kalybaeva | Dr. Gabriele Nordsiek | Ibrahim Sabra | Maren Scharfe | Prof. Dr. Mahavir Singh | Dr. Matthias Stehr | Hanaa Wanas

Sequenzanalyseprojekte Die Sequenzierung und Analyse von DNA ist eine Basistechnik der modernen biologischen Grundlagenforschung. Unsere Arbeit beinhaltet die vergleichende Sequenzanalyse von klinischen Isolaten aus pathogenen Organismen, wie z.B. *M. tuberculosis*. Im Fokus stehen Gene, die an der Virulenz, Persistenz, Antibiotikaresistenz und Wirtspräferenz beteiligt sind.

Wir haben ferner Genombereiche vom Pferd, Schwein und Rind analysiert, die unter dem Verdacht stehen, krankheitsassoziiert zu sein. Die ausführliche Annotation einer Reihe von Bakteriengenomen ist bereits erfolgt und kürzlich sequenzierten wir drei weitere Genome von Myxobakterien.

Durch die Implementierung zweier DNA-Sequencer der neuesten Generation (Illumina/Solexa) können wir die Genomanalyse sowohl quantitativ als auch qualitativ ausweiten (Abb. 1). Damit wurden Expressionsanalysen von Rind, Dachs, Maus und Mensch durchgeführt. Für ein RNAi-Screening mit komplexen Bibliotheken, insbesondere negativen Selektions-Screenings, haben wir das "Deep sequencing" etabliert und größere Mengen Proben analysiert. Ein weiterer Schwerpunkt lag bei der ChIP-Seq-Technik. Hierbei geht es um Wechselwirkungen zwischen Proteinen (wie z.B. Transkriptionsfaktoren) und DNA. Wir haben vor allem krankheitsrelevante menschliche Proben untersucht.

Mykogenome Ziel ist die Entwicklung neuer Methoden für Tuberkulose-Diagnostik und -Therapie. Der Schwerpunkt liegt auf der Identifizierung klinisch mehrfach-resistenter *Mycobacterium tuberculosis*-Stämme, sowie auf der Charakterisierung Virulenz-assoziiierter Proteine.

An der Tuberkulose sterben jährlich etwa zwei Millionen Menschen. Ein großes Problem sind mehrfach-resistente Erreger (MDR) oder extrem-resistente Erreger (XDR), die nur mit Reservemedikamenten behandelbar sind. Wir entwickeln Diagnostika für MDR-Tuberkulose.

Im EU-Projekt Fast-XDR-Detect wird ein Farbstoff-basierender Test im 96-Well-Plattenformat entwickelt, mit dem MDR-Tuberkulose detektiert werden kann. Dazu wurden die Genome zahlreicher klinischer *Mycobacterium tuberculosis*-Stämme sequenziert, um Resistenz-assoziierte Mutationen zu identifizieren (s. Abb. 2. S. 68). Sie werden im Test als molekulare Marker verwendet.

Im EU-Projekt FASTEST-TB suchen wir nach neuen mykobakteriellen Antigenen, also diagnostischen Proteinmarkern für Schnelltests im 96-Well-Plattenformat. Wir haben bisher über 100 neue Kandidatenproteine gefunden, die zurzeit evaluiert werden.

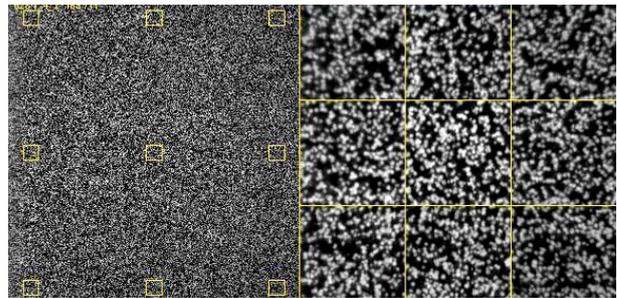


Abb. 1. Verteilung von DNA-Clustern zur Sequenzierung. Ungefähr zwei Jahre Technologieentwicklung führten zu einem Anstieg der Megabasen pro Sequenzierlauf um 1.500 Prozent. Fotos: HZI

Das Enzym Antigen85A synthetisiert das in der Zellwand am häufigsten vorkommende Glykolipid TDM (Trehalose 6,6'-dimycolat; Cord-Factor). Antigen85A ist ein wichtiger Baustein für die Zellwand, kann aber auch als Impfstoff verwendet werden. Das Enzym wurde rekombinant hergestellt und eine ausführliche Untersuchung der immunologischen Eigenschaften durchgeführt. Wir haben zum ersten Mal einen nicht-radioaktiven Test entwickelt und konnten wichtige enzymatische Parameter des Enzyms bestimmen. Der neue Test ist auch für Hochdurchsatz-Experimente geeignet und kann zur Durchmusterung von Substanzbanken verwendet werden.

Neuartige Bioinformatiktechnologie Wir erforschen die Anwendungsmöglichkeiten der Signaltheorie auf die funktionsorientierte Analyse von Biomolekülen. Wir wollen durch die Untersuchung der physikalisch-chemischen Eigenschaften Ähnlichkeiten, Homologien und Analogien ermitteln und die Ergebnisse mit Nasslabor-Daten bestätigen. Die Software "FeatureScan" ist über <http://genome.helmholtz-hzi.com/feature-scan> frei erhältlich. Unser System ermöglicht die Ermittlung merkmalsabhängiger Ähnlichkeiten, bei denen Systeme auf Basis von Buchstaben-Codes (A, C, T, G) scheitern. So konnten wir mit Hilfe unserer Methode beim Vergleich von Promotoren von Mensch und Schimpanse funktionelle Bereiche identifizieren, die uns mit herkömmlichen Methoden verborgen geblieben waren.

Deyneko, I.V., Kalybaeva, Y.M., Kel, A.E., & Blöcker, H. (2010) Human-chimpanzee promoter comparisons: Property-conserved evolution? *Genomics* 96, 129-133.

Von Groll A., Martin A., Stehr M., Singh M., Portaels F., da Silva P.E. & Palomino J.C. (2010) Fitness of *Mycobacterium tuberculosis* strains of the W-Beijing and Non-W-Beijing genotype. *PLoS One* 5, e10191.

Adhikary, T., Kaddatz, K., Finkernagel, F., Schonbauer, A., Meissner, W., Scharfe, M., Jarek, M., Blöcker, H., Müller-Brüsselbach, S., & Müller, R. (2011) Genomewide Analyses Define Different Modes of Transcriptional Regulation by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-beta/delta (PPARbeta/delta). *PLoS ONE* 6, e16344.



02 Wirt-Pathogen-Interaktionen

THEMENSPRECHER | Prof. Dr. Klaus Schughart | Abteilung für Infektionsgenetik | kls@helmholtz-hzi.de

Die verschiedenen Interaktionen zwischen Pathogen und Wirt haben einen entscheidenden Einfluss auf den Schweregrad einer Infektionserkrankung. Bisherige Untersuchungen haben sich im Wesentlichen auf die spezifischen Virulenzfaktoren des Pathogens konzentriert, während unser Wissen über wichtige Faktoren auf der Wirtsseite sehr begrenzt ist. Hierbei spielen sowohl Umweltfaktoren als auch genetische Faktoren des Wirts eine wesentliche Rolle. Gleichmaßen ist über die Zusammensetzung von bakteriellen Gemeinschaften im Wirt und darüber, wie diese die Aktivität von pathogenen Mikroben beeinflussen, nur sehr wenig bekannt. Auch sind viele Pathogene in der Lage, die Speziesbarriere zu überschreiten und so von tierischen Reservoirs auf den Menschen überzutreten. Über diese Prozesse und über die Anpassungsmechanismen der Pathogene an verschiedene Wirtsorganismen ist bislang nur wenig bekannt.

Ziel dieses Themengebietes ist es daher, ein besseres Verständnis für die Komplexität der Interaktionen von Wirt und pathogenen Mikroorganismen zu erhalten. Die verschiedenen Forschungsprojekte haben zum Ziel, die Wirtsfaktoren zu identifizieren, welche die Empfindlichkeit oder die Resistenz gegenüber Infektionserkrankungen beeinflussen. Zudem sollen die molekularen Mechanismen der Überschreitung der Speziesbarriere untersucht werden, und es soll studiert werden, wie mikrobielle Gemeinschaften die Antwort des Wirts gegenüber einem Pathogen verändern können.

Mikrobielle Gemeinschaften und ihre Bedeutung für den Verlauf von Infektionserkrankungen

In der Mundhöhle wurden bislang etwa 500 verschiedene bakterielle Spezies identifiziert. Viele davon sind in der Lage, Biofilme in sogenannten Dentalplaques auszubilden. Um Biofilme ausbilden zu können, müssen die verschiedenen bakteriellen Spezies miteinander kommunizieren. Daher untersuchen wir die molekularen Grundlagen der bakteriellen Kommunikationswege und Möglichkeiten, diese spezifisch zu stören.

In der Lunge von Mukoviszidose-Patienten stellt das Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* den am häufigsten vorkommenden Keim dar. Allerdings wurde beobachtet, dass in Isolaten von diesen Patienten mehrere verschiedene Varianten der Spezies *P. aeruginosa* zu finden sind und das Auftreten bestimmter Varianten mit einer schlechten Prognose korreliert ist. Wir untersuchen daher die biologischen und molekularen Mechanismen der phänotypischen Veränderungen, die zu der beobachteten Diversität in den bakteriellen Gemeinschaften und in Isolaten von Mukoviszidose-Patienten führen.

Biofilme spielen eine wichtige Rolle bei der Kolonisation des Wirts mit pathogenen Bakterien. Bislang ist allerdings nur sehr wenig über bakterielle Gemeinschaften in Biofilmen, deren Biodiversität und damit verbundene Pathogenität im Wirt bekannt. Daher untersuchen wir die Biodiversität in Biofilmen, die sich auf Herzschrittmachern und in Zahn- oder Knochenimplantaten ausgebildet haben. Basierend auf den Erkenntnissen zu diesen bakteriellen Gemeinschaften in den verschiedenen biologischen Nischen des menschlichen Körpers werden neue Ansätze zur Kontrolle oder Verhinderung der Ausbildung von Biofilmen erforscht. Hierbei wird u. a. nach Möglichkeiten gesucht, wie sich durch die gezielte Beeinflussung der Gemeinschaften in Biofilmen pathogenen Bakterien ausschließen lassen.

Die Nasenhöhlen und der Gastrointestinaltrakt beherbergen eine Vielzahl verschiedener bakterieller Spezies. Einige davon sind von Vorteil für den Wirt, während andere zu schweren Erkrankungen führen können. Wir versuchen heraus zu finden, welche Bedingungen die Kolonisation dieser Lebensräume mit pathogenen Bakterien favorisieren oder verhindern. Ein besonderes Augenmerk wird hierbei auf das Vorkommen des multi-resistenten pathogenen Bakteriums *Staphylococcus aureus* in diesen Gemeinschaften und seine Interaktion mit anderen Spezies gelegt.

Experimentelle Modellsysteme zum Studium der Wirtsantwort gegenüber viralen und bakteriellen Pathogenen

Gruppe A Streptokokken sind weitverbreitete humane Pathogene, die verschiedene Erkrankungen verursachen können, von einer einfachen Pharyngitis bis hin zu sehr schweren, oft tödlichen Erkrankungen wie nekrotischer Faszitis oder toxischem Schock. Wir haben zuvor zeigen können, dass Mausstämme mit verschiedenen genetischen Hintergründen sich sehr stark in ihrer Anfälligkeit gegenüber einer Infektion mit *Streptococcus pyogenes* unterscheiden. Nun charakterisieren wir die immunologischen und molekularen Mechanismen, welche die Empfindlichkeit oder die Resistenz gegenüber *S. pyogenes* Infektionen bestimmen, um letztendlich neue Strategien zu entwickeln, die die Abwehr eines empfindlichen Wirtes stärken. Weiterhin führen wir Studien am Pathogen *Staphylococcus aureus* durch, das derzeit einer der wichtigsten bakteriellen Keime in den westlichen Industriestaaten ist.

Die Häufigkeit von *S. aureus* Infektionen hat in letzter Zeit sehr stark zugenommen, sowohl bei Krankenhausinfektionen als auch in der allgemeinen Bevölkerung. Trotz großer Fortschritte im Verständnis der Persistenz von *S. aureus* Erregern im Wirt, sind derzeit nur wenige Studien zum Beitrag von Wirtsfaktoren bei der Etablierung einer *S. aureus* Infektion durchgeführt worden. Die Erforschung dieser Frage ist vor allem deswegen nur zögerlich voran gekommen, weil es keine geeigneten experimentellen Tiermodelle gab. Wir haben daher ein Mausmodell etabliert, welches die wesentlichen Aspekte einer *S. aureus* Infektion rekapituliert. Unser Mausmodell erlaubt es, langfristige Infektionen mit *S. aureus* durchzuführen und ermöglicht uns auf diese Weise, die verschiedenen Aspekte der Wirtsabwehr während der unterschiedlichen Phasen einer Infektion zu studieren.

Das Influenza A Virus stellt eine der größten Bedrohungen für die menschliche Gesundheit dar. Derzeit ist nur wenig über die Faktoren bekannt, welche die Resistenz oder die Empfindlichkeit des Wirtsorganismus gegenüber einer Influenza-Infektion beeinflussen. Am HZI haben wir ein experimentelles Modellsystem für Infektionen mit verschiedenen Subtypen des Influenzavirus in der Maus entwickelt. Wir konnten sehr große Unterschiede in der LD₅₀ Antwort in verschiedenen Mausstämmen mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund beobachten. Wir führen nun vergleichende Studien zur Pathogenese, der Genexpressionsmuster in der Lunge, der Viruslast und der Immunantwort in verschiedenen Mausstämmen durch. Diese Erkenntnisse werden dazu verwendet, sogenannte „Quantitative Traits“ (QTLs) zu bestimmen, die das genetische Risiko eines schweren Infektionsverlaufs beschreiben. Potenzielle Kandidatengene innerhalb der QTL-Regionen, die für den unterschiedlichen Verlauf einer Infektion verantwortlich sein könnten, werden dann in Mausmutanten getestet, in denen ein bestimmtes Gen entfernt wurde.

Molekulare Grundlagen der Speziespezifität bei der Transmission von zoonotischen Infektionserregern

Das Prion Protein PrP^C aus Säugern ist in der Lage, seine Konformation von einer monomeren löslichen Form zu einer aggregierten unlöslichen Form, dem PrP^{Sc}, zu verändern. Sobald ein Prion von einem empfindlichen Wirt aufgenommen wurde, löst es eine Kaskade aus, die letztlich in einer Erkrankung resultiert. Verschiedene Prionenstämme können dabei zu verschiedenen pathologischen Veränderungen in einer bestimmten Wirtsspezies führen. Auch die Transmission von einer Spezies zu einer anderen wird wesentlich dadurch beeinflusst, inwieweit eine bestimmte Prionkonformation mit der primären Sequenz beider Spezies kompatibel ist. Die Übertragung von BSE auf den Menschen und die Resistenz des Menschen gegenüber Prionen aus Schafen sind gut bekannte Beispiele hierfür. Allerdings sind die zu Grunde liegenden Mechanismen dieser Prozesse bislang nicht verstanden. Das größte Hindernis für solche Studien war bislang die sehr begrenzte Möglichkeit, Prionen in ausreichenden Mengen herzustellen. Am HZI haben wir daher eine neue Technologie entwickelt, die diesen Engpass überbrückt. Insbesondere verwenden wir die NMR-Spektroskopie und andere biophysikalische Techniken, um die strukturellen Grundlagen der Transmissionsbarrieren sowie die Anpassung von Prionen an einen neuen Wirt zu studieren. Wir werden die 3D-Strukturen im Detail analysieren, um bessere Einsichten in die biophysikalischen Mechanismen der Konformationsänderungen zu erlangen, die den Übergang von PrP^C zu PrP^{Sc} erlauben. Weiterhin werden wir Untersuchungen zur Analyse von Wirt-Pathogen-Interaktionen bei verschiedenen Proteinen durchführen, welche die Übertragung von zoonotischen Viren und Bakterien mit beeinflussen.

Epidemiologische Studien zur Untersuchung von genetischen und umweltbedingten Risikofaktoren im Menschen

Die Ursachen menschlicher Erkrankungen beruhen auf einer Vielzahl von Faktoren, wie z. B. Umwelteinflüsse, Lebensstil und genetische Risikofaktoren. Um diese Faktoren besser erfassen zu können, werden wir die Häufigkeit des Auftretens von Infektionskrankungen im Zusammenhang mit verschiedenen Risikofaktoren beim Menschen bestimmen. Hierzu hat das HZI in Zusammenarbeit mit anderen Zentren der Helmholtz-Gemeinschaft und weiteren deutschen Universitäten den Aufbau einer nationalen prospektiven Kohortenstudie initiiert. Diese Kohorte wird etwa 200.000 gesunde Freiwillige aus ganz Deutschland rekrutieren. Wir werden Fragebögen entwickeln, um akute und chronische Infektionskrankungen, den Impfstatus und die Exposition zu Haus- und Nutztieren zu erfassen. Darüber hinaus werden mit Hilfe von Abstrichen aus der Nasenhöhle, dem Speichel und dem Stuhl die mikrobiellen Gemeinschaften untersucht werden. Die Teilnehmer der Kohorte werden über die nächsten 10-20 Jahre weiter beobachtet, um die allgemeinen Risiken zu bestimmen, die zur Entstehung einer Infektionskrankung führen, aber auch um sekundäre Erkrankungen zu erfassen, die direkt oder indirekt mit einer Infektion in Verbindung stehen.



02.1 Pathogenese von chronischen *Pseudomonas aeruginosa* Infektionen

PROJEKTLEITERIN | Prof. Dr. Susanne Häußler | Arbeitsgruppe Chronische *Pseudomonas* Infektionen | sus@helmholtz-hzi.de

PROJEKTMITARBEITER | Dr. Andreas Dötsch | Dr. Mathias Müsken | Juliane Schmidt | Sebastian Schulz | Dr. Piotr Bielecki

Die Erfolge der modernen Medizin werden zunehmend durch opportunistische bakterielle Infektionen beeinträchtigt. In chronischen Infektionen schließen sich die Erreger häufig in sogenannten Biofilmen zusammen. So sind sie sehr wirksam vor Angriffen des Immunsystems oder Antibiotika geschützt. Außerdem verschafft das Leben in der Population den Bakterien zusätzliche Mechanismen der Anpassung, die weit über eine übliche Reaktion der Einzelzellen auf Stresssituationen hinausgehen. Sie profitieren dabei insbesondere von ihrer Diversität und von Kooperationen untereinander.

Diversität erleichtert das Überleben *Pseudomonas aeruginosa* ist der dominante pathogene Erreger der chronischen Infektion der Lunge von Mukoviszidose-Patienten. Obwohl die meisten Patienten mit nur einem *P. aeruginosa* Klon kolonisiert sind, finden wir verschiedene bakterielle Morphotypen in der Lunge. Diese morphologische Diversität des einzelnen Klons scheint eine große Rolle bei der Persistenz des Keims und damit der Ausbildung einer chronischen Infektion zu spielen. Wir wollen die molekularen Mechanismen aufklären, die der Generierung dieser Diversität zugrunde liegen.

Mutation und Selektion – Schlüssel für die Entstehung von Diversität Bei Mukoviszidose-Patienten mit einer chronischen *P. aeruginosa* Infektion der Lunge finden wir gehäuft sogenannte „Small Colony Variants“ (SCVs), die besonders effizient Biofilme ausbilden. Der biofilmbildende SCV Phänotyp ist charakterisiert durch die Expression des „Chaperone Usher Pathway“ (*cupA*) Genklusters. *CupA* kodiert für bakterielle Fimbrien und wird über eine Modulation eines bakteriellen Signalmoleküls, des zyklischen di-GMP (c-di-GMP), reguliert. Um die Mutationen zu identifizieren, die der Entstehung des *P. aeruginosa* Biofilm-Phänotyps zugrunde liegen und die bei der Entwicklung von Resistenzen gegenüber Antibiotika eine entscheidende Rolle spielen, sequenzieren wir die Genome von klinischen *P. aeruginosa* Stämmen mittels der sogenannten *next generation sequencing* Technologie. Bei der vergleichenden Analyse der chromosomalen DNA von *P. aeruginosa* Pools mit ähnlichen phänotypischen Eigenschaften, suchen wir nach konsistenten Basenaustauschen und überprüfen, ob diese ursächlich an der Ausprägung des Phänotyps beteiligt sind. In Zukunft wollen wir so klinisch relevante adaptive Mutationen identifizieren, die in *P. aeruginosa* unter *in vitro* Biofilm-Wachstumsbedingungen und *in vivo* im Laufe einer chronischen Infektion entstehen. Das Wissen um die Genotypen, die zu unterschiedlichen Infektionsstadien

selektioniert werden, soll uns helfen, neue erfolgsversprechende Therapiestrategien zu entwickeln.

Interbakterielle Kommunikation steuert die Entstehung bakterieller Diversität und von Biofilmen *P. aeruginosa* produziert neben zwei gut charakterisierten Homoserinlaktone-Signalmolekülen ein drittes interbakterielles Signalmolekül, das Pseudomonas-Quinolone-Signal (PQS). PQS reguliert in Abhängigkeit von der Zelldichte – ebenso wie die Homoserinlaktone – die Produktion von Virulenzfaktoren und ist essenziell an der Etablierung von *P. aeruginosa* Biofilmen beteiligt. Der molekulare Mechanismus der Umsetzung des PQS Signals in ein bakterielles Verhalten der einzelnen Zellen ist allerdings weitestgehend unbekannt. Ein Enzym, das von *pqsE* kodiert ist, dem letzten Gen auf dem PQS Biosynthese Operon, scheint dabei eine zentrale Rolle zu spielen. Die Aufklärung der Funktion von *pqsE* ist ein großer Schwerpunkt in unserer Arbeitsgruppe.



Susanne Häußler während der Vorbereitung für ein neues Experiment Foto: Twincore/HZI

Pommerenke C, Müsken M, Becker T, Dötsch A, Klawonn F, Häußler S. (2010). Genotype-Phenotype correlation in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathogens*. 6(8): e1001074.

Müsken M, Di Fiore S, Römmling U, Häußler S. (2010) 96-well plate based optical method for the quantitative and qualitative evaluation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and its application for susceptibility testing. *Nature Protocols* 5(8):1460-9. Epub 2010 Jul 29.

Dötsch, A., F. Klawonn, M. Jarek, M. Scharfe, H. Blöcker, S. Häußler. (2010). Evolutionary conservation of essential and highly expressed genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Genomics*. 11(1):234.

Müsken M, Di Fiore S, Dötsch A, Fischer R, Häußler S. (2010) Genetic determinants of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm establishment. *Microbiology*. 156:431-41

Häußler S. (2010) Multicellular signalling and growth of *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Medical Microbiology*. 300(8):544-8.

Häußler S, Parsek MR. Biofilms 2009; (2010) new perspectives at the heart of surface-associated microbial communities. *Journal of Bacteriology*. 192(12):2941-9.



02.2 Entschlüsselung der Mechanismen der Wirtsimmunabwehr gegenüber Gram-positiven Krankheitserregern im Mausmodell

PROJEKTLEITER | Priv.-Doz. Dr. Eva Medina | Arbeitsgruppe Infektionsimmunologie | eme@helmholtz-hzi.de

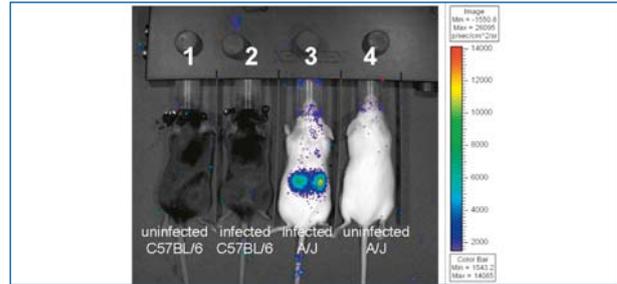
PROJEKTMITARBEITER | Dr. Oliver Goldmann | Dr. Jens Abel | Christina Ziegler | Daniela Bruhn | Alva Rosendahl

Staphylococcus aureus und *Streptococcus pyogenes* sind bedeutende Humanpathogene. Der Fokus der Arbeitsgruppe Infektionsimmunologie ist es, die Immunmechanismen, die an der Pathogenabwehr beteiligt sind, aufzuklären.

Das Mausmodell zur Untersuchung der genetischen Prädisposition für schwere *S. aureus* Infektionen Eine der Besonderheiten bei *S. aureus* Infektionen ist die große Variabilität der Krankheitsbilder, welche von milden bis zu letalen klinischen Manifestationen reichen können. Genetisch determinierte Variationen des Immunsystems könnten eine wichtige Rolle in der Heterogenität der Immunantwort gegenüber diesem Pathogen spielen. Wir haben die Immunmechanismen, die einer genetischen Prädisposition für schwere *S. aureus* Infektionen zugrunde liegen, im murinen System untersucht. Unsere Ergebnisse zeigen signifikante linienabhängige Variationen in der Resistenz gegenüber diesem Erreger. C57BL/6 Mäuse zeigten sich resistent und überlebten die Infektion, während A/J, DBA/2 und BALB/c Mausstämme der Infektion erlagen. Diese Anfälligkeit war mit der Unfähigkeit der Tiere assoziiert, das bakterielle Wachstum vor allem in der Niere zu kontrollieren (Abb. 1).

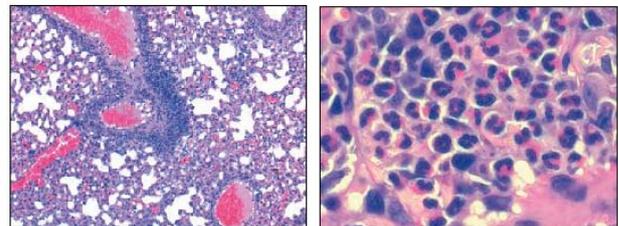
Neutrophilen-Depletion macht resistente Tiere komplett anfällig gegenüber *S. aureus*. Dies zeigt, dass diese Zellen essenziell für die beobachtete Resistenz sind. Ferner ist die Expression der chemoattraktant-Proteine KC und MIP-2 sehr viel früher nach der Infektion in den Nieren von C57BL/6 zu finden als in denen von A/J Mäusen. Dies ist ein Indiz, dass eine verzögerte Rekrutierung von Neutrophilen an den Infektionsort die verstärkte Anfälligkeit von A/J gegenüber *S. aureus* Infektionen bedingt. Die bessere Resistenz von C57BL/6 lässt sich damit durch die effektivere Leukozyten-Rekrutierung erklären, welche den Erreger sehr früh im Infektionsprozess unter Kontrolle bringt.

Die Rolle von TLR/MyD88 Signalling in der Pathophysiologie von *S. pyogenes* Infektionen *S. pyogenes* stellt einen der häufigsten Gründe für mild verlaufende Infektionen z.B. der Haut dar. Sie haben jedoch das Potenzial, lebensbedrohliche, invasive Krankheitsbilder wie die Nekrotisierende Fasziiitis oder Septikämien zu verursachen. Wir konnten in *in vitro* Studien eine Rolle des sog. „myeloid differentiation factor 88“ (MyD88) in der Immunabwehr gegenüber *S. pyogenes* zeigen. Im Mausmodell konnten wir zeigen, dass MyD88^{-/-} Mäuse signifikant größere Bakterienlasten in den Organen aufwiesen und der Infektion schneller erlagen als MyD88^{+/+} Tiere. Die Abwesenheit von MyD88 resultierte in einer verminderten Produktion inflammatorischer Zytokine, wie IL-12, IFN- γ und TNF- α sowie der chemoattraktant-Proteine MIP-2 und KC. Dies reduziert die Rekrutierung von Effektorzellen an den Infektionsort, die für die Infektions-



Bakterienlast in resistenten C57BL/6 (Maus 2) und anfälligen A/J (Maus 3) Mäusen, 24 h nach Infektion mit dem biolumineszenten *S. aureus* Stamm SH1000 ALC2906. Nicht infizierte C57BL/6 (Maus 1) und A/J (Maus 4) dienen als Kontrolle.

kontrolle wichtig sind (Makrophagen und Neutrophile). Des Weiteren zeigten nur MyD88^{-/-} nicht aber Wildtyp-Tiere eine massive Infiltration von Eosinophilen in betroffene Organe (Abb. 2). Durch eine unzureichende Produktion regulatorischer Chemokine wie MIG/CXCL9 und IP-10/CXCL10 wird die Transmigration von Eosinophilen inhibiert. Unsere Ergebnisse zeigen, dass MyD88 Signalling Effektorzellen am Ort einer Streptokokkeninfektion beeinflussen und die Extravasation von Zellen verhindern, die Gewebeschäden verursachen können. Daher kann MyD88 Signalling als wichtiger Faktor zur Modulierung der Qualität der inflammatorischen Immunantwort angesehen werden, um eine optimale Effektorfunktion des Immunsystems sicherzustellen.



Hematoxylin- und Eosin-Färbung von Lungenschnitten von *S. pyogenes* infizierten MyD88^{-/-} Mäusen, 20 h nach subkutaner Inokulation mit *S. pyogenes*. Links: zelluläre Infiltration. Rechts: Detailuntersuchungen der inflammatorischen Zellen in den Lungen von infizierten MyD88^{-/-} Mäusen zeigen, dass diese Zellen eine rot-violette Cytoplasmafärbung sowie einen zweilappigen, blauen Kern aufweisen, die typisch für Eosinophile sind.

von Köckritz-Blickwede M., Rohde M., Oehmcke S., Miller L.S., Cheung A.L., Herwald H., Foster S., and Medina E. (2008). Immunological mechanisms underlying the genetic predisposition to severe *Staphylococcus aureus* infection in the mouse model. *American Journal of Pathology*. 173:1657-68.

von Köckritz-Blickwede M., Konrad S., Foster S., Gessner J.E., and Medina E. (2009). Protective role of complement C5a in an experimental model of *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Journal of Innate Immunity*. 2:87 - 92.



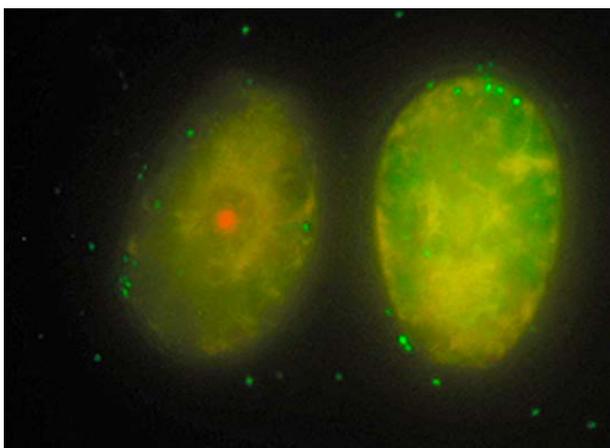
02.3 Mikrobielle Kommunikation

PROJEKTLEITER | Prof. Dr. Irene Wagner-Döbler | Arbeitsgruppe Mikrobielle Kommunikation | iwd@helmholtz-hzi.de

PROJEKTMITARBEITER | Dr. Helena Sztajer | Dr. Brigitte Kunze | Dr. Michael Reck | Andre Lemme | Xiaoli Xue | Ina Buchholz | Jürgen Tomasch | Thomas Riedel | Diana Patzelt | Szymon Safranski | Hui Wang

Bakterien synthetisieren Signalmoleküle, sogenannte Auto-inducer, die ins Medium ausgeschieden werden und wichtige physiologische Eigenschaften in Abhängigkeit von ihrer Konzentration regulieren. Diese wird von speziellen Rezeptoren in der Membran oder im Zellinneren „gemessen“. Oberhalb eines Grenzwertes, dem sogenannten Quorum, induzieren die Signalmoleküle zum Beispiel die genetische Kompetenz bei dem Kariesbakterium *Streptococcus mutans*, was zu verstärktem genetischen Austausch und Biofilmbildung führt. Diese Art der Kommunikation zwischen Bakterienzellen heißt daher *Quorum Sensing* und spielt eine zentrale Rolle bei Infektionen und Symbiosen. Das Verständnis der Mechanismen des *Quorum Sensing* eröffnet neue Möglichkeiten, Infektionen zu beeinflussen und potenzielle Alternativen für Antibiotika zu entwickeln.

Interkingdom signalling: Das Kariesbakterium *Streptococcus mutans* hemmt die Hyphenbildung des humanpathogenen Pilzes *Candida albicans* *Streptococcus mutans* ist ein Bestandteil der polymikrobiellen Biofilme auf Zähnen und stark mit der Bildung von Karies assoziiert. Neben hundert von anderen Bakterienarten kommen in der Mundhöhle auch Pilze vor, z.B. der humanpathogene Pilz *Candida albicans*, der bei immungeschwächten Patienten, nach Antibiotikatherapien oder im Alter zu unangenehmen Pilzinfektionen führen kann. Bei Untersuchungen an Signal-



Dinoroseobacter shibae auf seiner Wirtsalge, dem marinen Dinoflagellaten *Prorocentrum lima*. Die Bakterien sind durch CARD-FISH (catalyzed reporter deposition fluorescent in situ hybridisation) spezifisch angefärbt. Die restliche Bakterienflora ist unter diesen Bedingungen unsichtbar. Der orange Punkt ist das sogenannte Pyrenoid, eine Region des Plastiden, die besonders hohe Konzentrationen des Enzyms *Rubisco* enthält. Foto: HZI

molekülen von *S. mutans* sind wir auf eine fettsäureähnliche Verbindung gestoßen, SDSF (Streptococcus diffusible signal factor). Sie unterdrückt die Bildung von Hyphen von *C. albicans*, die für die Virulenz und die Biofilmbildung sehr wichtig sind. SDSF hat starke strukturelle Ähnlichkeit zu Farnesol, dem *Quorum Sensing* Signal von *C. albicans*, so dass es sich hier um eine Art *Quorum Sensing* Mimikry über große phylogenetische Distanz, d.h. zwischen dem Reich der Bakterien und dem Reich der Pilze, handelt.

Suche nach Inhibitoren für Biofilmbildung Wir haben kleine chemische Moleküle identifiziert, mit denen die mikrobielle Kommunikation gestört werden kann. Besonders interessant ist Carolacton, das von dem Bodenbakterium *Sorangium cellulosum* gebildet wird, da es nicht antibiotisch oder zytotoxisch wirkt, sondern selektiv die Biofilmbildung bei *Streptococcus mutans* hemmt. Carolacton führt zu Membranschädigung und Zelltod und stört dadurch die Biofilmentwicklung. Untersuchungen mittels Microarray lassen vermuten, dass durch Carolacton mehrere der Zweikomponentensysteme, die in *S. mutans* die Anpassung an Umweltbedingungen und das *Quorum Sensing* steuern, gehemmt werden. Mechanismus und mögliche Anwendungen von Carolacton für die Kariesprophylaxe werden derzeit in einem systembiologischen Verbundprojekt untersucht.

Quorum Sensing bei *Roseobacter* Die Bakterien der *Roseobacter* Gruppe spielen eine große Rolle für die Stoffkreisläufe im Meer, da sie dort bis zu 25% aller Bakterienzellen ausmachen können. *Dinoroseobacter shibae*, einer der beiden Modellorganismen im Transregio *Roseobacter*, lebt in Symbiose mit einzelligen, marinen Algen. *D. shibae* versorgt die Algen mit den lebenswichtigen Vitaminen B12 (Cobalamin) und B1 (Thiamin) und bekommt dafür Zucker für seinen heterotrophen Stoffwechsel. Wir untersuchen derzeit die Rolle von *Quorum Sensing* für diese Symbiose sowie die Bedeutung der Photosynthese für den Stoffwechsel des Bakteriums, das im Licht durch Photophosphorylierung ATP gewinnt, weniger Kohlenstoff verbrennen muss und damit CO₂ „spart“.

Xue, X., Tomasch, J., Sztajer, H., and I. Wagner-Döbler (2010). The delta subunit of RNA polymerase, RpoE, is a global modulator of *Streptococcus mutans* environmental adaptation. *Journal of Bacteriology*. **192**:5081-92.

Kunze B, Reck M, Dötsch A, Lemme A, Schummer D, Irschik H, Steinmetz H, Wagner-Döbler I. (2010) Damage of *Streptococcus mutans* biofilms by carolacton, a secondary metabolite from the myxobacterium *Sorangium cellulosum*. *BMC Microbiology*. **10**:199.

Wagner-Döbler, I., Ballhausen B, Baumgart M, Brinkhoff T, Buchholz I, Bunk B, Cypionka H, Daniel R, Drepper T, Gerds G, Hahnke S, Han C, Jahn D, Kalhoefer D, Kiss H, Klenk H-P, Kyrpidis N, Liebl W, Liesegang H, Meincke L, Pati A, Petersen J, Piekarski T, Pommerenke C, Pradella S, Pukall R, Rabus R, Stackebrandt E, Thole S, Thompson L, Tielen P, Tomasch J, von Jan M, Wanphrut N, Wichels A, Zech H, Simon M. (2010) The complete genome sequence of the algal symbiont *Dinoroseobacter shibae* – a hitchhiker’s guide to life in the sea. *ISME Journal*. **4**(1):61-77.



02.4 Die Genetik von Infektionen und Immunität

PROJEKTLEITER | Prof. Dr. Klaus Schughart | Abteilung Infektionsgenetik | kls@helmholtz-hzi.de

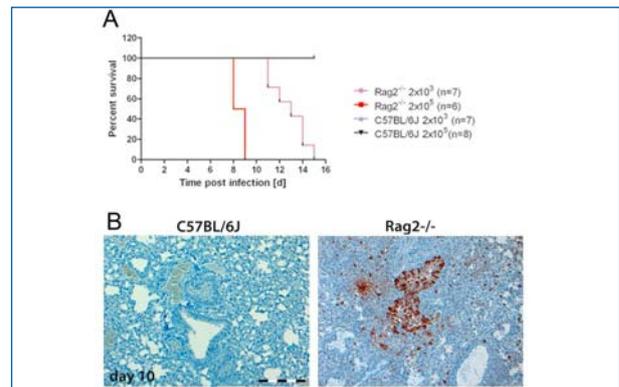
PROJEKTMITARBEITER | Dr. Rudi Alberts | Dr. Mahmoud Bahgat | Leonie Dengler | Dr. Feng He | Dr. Bastian Hatesuer | Dr. Berenike Henneberg | Dr. Heike Kollmus | Dr. Tatiana Nedelko | Dr. Bastian Pasche | Dr. Claudia Pommerenke | Dr. Nuno Viegas | Dr. Esther Wilk | Silke Bergmann | Barkha Bhatnagar | Paulina Blazéjewska | Hairong Chen | Haiya Wu

In unserer Arbeitsgruppe untersuchen wir den Einfluss genetischer Faktoren des Wirts, die zur Schwere des Krankheitsverlaufes bei einer Influenza A Virus-Infektion beitragen. Hierzu führen wir Studien in genetisch definierten Mauspopulationen durch. Diese Populationen bestehen aus Familien, die unterschiedliche genetische Hintergründe aufweisen oder die eine Deletion in einem bestimmten Gen tragen.

Jedes Jahr sterben in Deutschland etwa 10.000 bis 30.000 Personen an den Folgen einer Infektion mit dem Influenzavirus. Die bislang schwerwiegendste Pandemie im Jahre 1918 führte zu geschätzten 30 bis 50 Millionen Todesfällen weltweit. Eine Besonderheit des Influenzavirus besteht darin, dass es seine Oberflächeneigenschaften schnell ändern und somit einer vorhandenen Immunität des Wirtes entkommen kann. Zudem ist sein Genom segmentiert, und diese Segmente können zwischen verschiedenen Virus-Subtypen ausgetauscht werden. Letzteres kann in anderen Spezies erfolgen und Viren, die so neu entstanden sind, können sich an den Menschen anpassen und dann Pandemien hervorrufen.

Es werden beim Menschen genetische Faktoren vermutet, die die Schwere des Krankheitsverlaufes beeinflussen können. Allerdings sind diese genetischen Faktoren aufgrund der unterschiedlichen Umweltfaktoren, wie z. B. Ernährung, Vorerkrankungen oder Medikamentenbehandlung, im Menschen nur sehr schwer zu erfassen. Deshalb haben wir ein experimentelles Modellsystem in der Maus etabliert. Hier studieren wir den Krankheitsverlauf in verschiedenen Mausfamilien, wie z. B. in Inzuchtlinien oder in Familien, in denen zwei oder mehr parentale Genome segregieren, oder in Familien, in denen definierte Bereiche des Genoms aus Zuchten von Wildmäusen in das Genom von Labormäusen übertragen wurden. Zusätzlich untersuchen wir Familien, die eine Mutation in einem bestimmten Gen tragen.

In unseren bisherigen Studien konnten wir in der Maus einen klaren Einfluss des genetischen Hintergrundes für die Empfindlichkeit des Wirts nachweisen. Eine der untersuchten Mausfamilien, der Inzuchtstamm DBA/2J, war extrem empfindlich gegenüber einer Infektion mit einem Laborstamm des H1N1-Virus, während eine andere Familie, C57BL/6J, sehr resistent war. Das Influenzavirus vermehrte sich viel schneller in der empfindlichen Mausfamilie, die zudem eine sehr heftige Entzündungsreaktion zeigte. Unsere bisherigen Daten lassen vermuten, dass sowohl die starke Virusvermehrung als auch die überschießende Entzündungsreaktion zum Tod der empfindlichen Mäuse führt. Weiterhin konnten wir in Mausmutanten zeigen, dass die *Rag2* und *Irf7* Gene für eine erfolgreiche Wirtsabwehr gegenüber einer H1N1-Infektion essenziell sind.



(A) Gewichtsverlust und später Tod in Mäusen mit einer Deletion des *Rag2* Gens. Die *Rag2*-Mutation führt zur Abwesenheit von T- und B-Zellen der adaptiven Immunantwort. *Rag2*-mutante Mäuse überleben die frühe Phase der Infektion, da das angeborene Immunsystem das Virus bis zu einem gewissen Maß kontrolliert, aber die Mäuse versterben später, weil das Virus nicht vollständig beseitigt werden kann. (B) Histologische Schnitte von Mauslungen nach Infektion mit dem Influenzavirus. In *Rag2*-mutanten Mäusen sind auch 10 Tage nach Infektion infizierte Zellen (braune Färbung) nachzuweisen, die das virale NP-Antigen enthalten, während in den Zellen der Wildtypmaus (C57BL/6J) keine Virusantigene mehr zu finden sind. (Reproduktion nach Wu et al., 2010).

Wir führen derzeit genomweite Expressionsstudien über den gesamten Verlauf einer Infektion durch, um die Aktivierung spezifischer Gene mit molekularen und zellulären Komponenten der Wirtsantwort sowie die damit einhergehenden pathologischen Veränderungen in der Lunge zu korrelieren.

Unsere Arbeiten sind in verschiedene nationale und internationale Forschungsprogramme integriert. Wir koordinieren die Forschungsnetzwerke GeNeSys (German Network for Systems Genetics) und SYSGENET (europäisches Netzwerk für System Genetik zum Verständnis menschlicher Erkrankungen), und wir beteiligen uns aktiv in den Netzwerken FluResearchNet (deutsches Influenzaforschungsnetzwerk), Infrafrontier (europäisches Netzwerk zur Etablierung einer Phänotypisierung- und Archivierungsinfrastruktur), CASIMIR (europäisches Netzwerk zur Integration von Maus-Datenbanken) und dem CTC (weltweites Konsortium für komplexe Genetik).

P. Blazéjewska, L. Koscinski, N. Viegas; D. Anhlan; S. Ludwig; K. Schughart, (2011). Pathogenicity of different PR8 influenza A virus variants in mice is determined by both viral and host factors. *Virology Journal*, **412**(1):36-45

M. Bahgat, P. Blazéjewska, and K. Schughart. Inhibition of lung serine proteases in mice: a new approach to control influenza infection. *Virology Journal*, **8**:27

02.5 Die strukturelle Basis von Übertragungsbarrieren für Säugetierprionen

PROJEKTLEITER | Dr. Thorsten Lührs | Nachwuchsgruppe Strukturbasierte Infektionsbiologie | tlu07@helmholtz-hzi.de

PROJEKTMITARBEITER | Dr. Felix Deluweit | Dr. Vandana Gupta

Das Protein des Säugetierprions, PrP^C, kann seine Konformation von einem monomeren, löslichen in einen aggregierten, übertragbaren Prionenzustand, PrP^{Sc}, ändern. Sobald ein Prion in einen suszeptiblen Wirt eingedrungen ist, löst es eine zu einer Prionenerkrankung führende PrP-Konversionskaskade aus (Abb. 1A). Es wurde beobachtet, dass interspezies-Übertragungsbarrieren mit der Aminosäuresequenz des PrP korrelieren. Andererseits wurden multiple Prionenstämme derselben PrP-Aminosäuresequenz identifiziert, die bei der Wirtsspezies charakteristische Erkrankungen hervorrufen. Wir untersuchen die 3D-Strukturen der Prionen, um die Übertragungsbarriere zwischen Mäusen und Hamstern auf atomarer Ebene und die strukturelle Basis der Prionenstämme in Bezug auf den Prionenwirtsbereich zu verstehen. Dazu haben wir eine neuartige Methode entwickelt, um spezifische aggregierte Prion-Konformationen *in vitro* herzustellen. Wir verwenden eine Kombination aus *solution*-NMR, *solid*-

state-NMR und anderen biophysikalischen und chemischen Verfahren, um strukturelle Aussagen über Prionaggregate zu erhalten.

Übertragungsbarrieren Zwischen den verschiedenen Säugetierspezies besteht in der Regel eine Speziesbarriere: Mäuse entwickeln keine Prionenerkrankung, wenn sie Hamsterprionen ausgesetzt sind. Transgene Mäuse, die zusätzlich Hamster-PrP exprimieren, können mit Hamsterprionen infiziert werden und bauen dann das Hamster-PrP selektiv in die Prionenpartikel ein. Die ausschließliche Expression von chimärem Maus-/Hamster-PrP, mit der Bezeichnung MH2M, macht Mäuse sowohl Hamsterprionen als auch Mausprionen gegenüber suszeptibel. Die dabei entstehenden Prionen übertragen die Krankheit sowohl auf Wildtyp-Hamster als auch auf Wildtyp-Mäuse. Somit ist die Speziesbarriere teilweise durch die primäre Aminosäuresequenz des Prionproteins bestimmt, wobei die Substitution von nur wenigen Aminosäureresten die Prionenübertragungsmuster vollständig verändern kann. Dieses Konzept hat eine große Bedeutung, da ein kausaler Zusammenhang zwischen der beim Menschen vorkommenden Variante der Creutzfeld-Jacob-Krankheit und dem Kontakt mit BSE-Prionen von Rindern besteht.

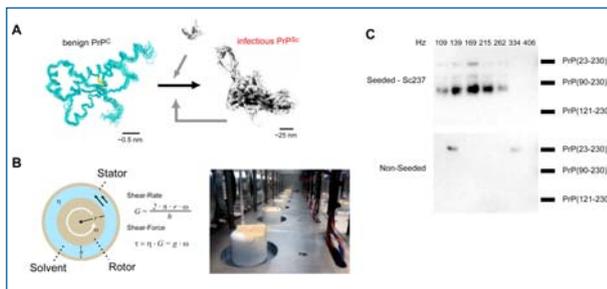


Abb. 1. Fortschritt bei der Prion *in vitro*-Amplifikation. (A) Das gutartige zelluläre Prionprotein, PrP^C, ist ein häufig vorkommendes Säugetierprotein, das allerdings auch einer Konformationsänderung und -aggregation zu einem infektiösen Prion unterliegen kann, PrP^{Sc}. (B) Wir haben eine neue Methode entwickelt, die spezifische Scherkräfte (links) für eine effiziente *in vitro*-Amplifikation von Prionen benutzt. Ein Gerät, der Shear Induced Fragmentation/Aggregation (ShIF/A) Array, ist von unserer Arbeitsgruppe zur effizienten Optimierung von vielen parallelen Konvertierungsreaktionen entwickelt worden. (C) Mittels ShIF/A können wir rekombinante PrP^C in Proteinase K-resistente PrP^{Sc}-Aggregate konvertieren, wenn wir natürliche Hamster Sc237-Prionen als Kerne benutzen (oben). In Reaktionen ohne entsprechende Kerne wird keine Proteinase K Resistenz beobachtet (unten). Für eine optimale Prion-Amplifikation muss die Rotationsfrequenz des Rotors innerhalb enger Grenzen kontrolliert werden.

Probenaufbereitung von Prionen und Strukturanalyse

Ein wichtiges Verfahren ist die Konversion von mit Isotopen markiertem (²H, ¹³C und ¹⁵N) rekombinantem PrP in PrP^{Sc}. Für eine homogene Partikelvorbehandlung haben wir 2010 ein neuartiges Verfahren entwickelt (Abb. 1B/C), und zur weiteren Reinigung und Charakterisierung verwenden wir die asymmetrische Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung (AF4). Mit diesem chromatographieähnlichen Verfahren kann man Partikel nach ihrer Größe trennen, ohne dass eine stationäre Matrix benötigt wird. Gleichzeitig werden die absoluten hydrodynamischen Eigenschaften der einzelnen Partikelfraktionen durch eine vielwinklige und dynamische Lichtstreuung bestimmt. Dieses Verfahren kommt auch zur Charakterisierung des Oligomerisationszustandes anderer Proteine routinemäßig zum Einsatz.

Basisverfahren zur Proteinstrukturbestimmung sind die NMR-Spektroskopie von Lösungen und Feststoffen, aber auch andere biophysikalische Verfahren wie Fluoreszenz-, FTIR- und CD-Spektroskopie. Der Vorteil ist, dass diese Methode gegenüber geringen strukturellen Unregelmäßigkeiten der untersuchten Proteinansammlungen unempfindlich ist. So ist es möglich, zu einer "Konsensusstruktur" zu gelangen, die wichtige strukturelle Einblicke liefert.



02.6 Biofilm-Gemeinschaften

PROJEKTLEITER | Dr. Wolf-Rainer Abraham | Arbeitsgruppe Chemische Mikrobiologie | wab@helmholtz-hzi.de

PROJEKTMITARBEITER | Andreia B. Estrela | Ahmed S. Gebreil | Dr. Marcela G. Heck | Rolf Kramer | Dr. Heinrich Lünsdorf | Maira Peres de Cavalho | Esther Surges

Das Projekt versteht Lebensgemeinschaften von Mikroorganismen in Biofilmen als funktionelle Einheiten. Wir verfolgen das Ziel, durch Erkundung der Artenvielfalt von Mikroben und deren Zusammenwirken neue Wege zu ihrer Kontrolle zu finden. Dabei steht im Fokus, dass in der Natur Bakterien zumeist nicht als Reinstämme, sondern fast immer in Gemeinschaften leben. Besonders interessant ist, wie sich pathogene Bakterien in ihrem Wirt verhalten und wie sie mit nicht- oder fakultativ pathogenen Bakterien in Biofilmen im menschlichen Körper umgehen.

Entwicklung dentaler Biofilme Eine der Hauptkomplika-tionen bei klinischen Implantaten ist die Infektion, die meist mit einer Biofilm-Bildung auf dem Implantat einhergeht. Solche Biofilme sind schwer zu bekämpfen, da die Bakterien in Biofilmen besondere Schutzmechanismen gegen Anti-biotika und das Immunsystem besitzen. Probleme treten insbesondere in der Mundhöhle auf, die von Natur aus von einer Vielzahl unterschiedlicher Bakterien besiedelt ist. Wir wollten wissen, welche Bakterien mit der Besiedlung der Implantate in der Mundhöhle beginnen. Dazu haben wir zwei Wochen alte Biofilme von Zahnimplantaten verschie-dener Patienten untersucht. Wir fanden stets komplexe Gemeinschaften von Bakterien. Durch statistische Analyse konnten wir zeigen, dass es einige charakteristische Bakte-rienarten gibt, welche an bestimmten Stellen des Implan-tats immer wieder vorkommen und somit charakteristisch für diese Orte sind. Interessanterweise fanden wir an den Implantaten häufiger Streptokokken als an den natürlichen Zähnen derselben Patienten, konnten aber keine Häufung pathogener Bakterien finden.

Metabolische Aktivitäten in Biofilmen Das Wissen, welche Bakterien in welchen Biofilmen vorkommen – und an welchen Stellen –, ist aber nur der erste Schritt, um das komplexe Phänomen Biofilm zu verstehen. Die Nutzung von Substraten durch die einzelnen Bakterien in der Biofilm-Gemeinschaft ist ein weiterer wichtiger Faktor. Um zu klären, wie schnell und wie stark ein Substrat von Bakterien auf-genommen wird, setzen wir Substrate ein, die mit stabilen Isotopen, also nicht radioaktiv, markiert sind. Darüber verfolgen wir den Einbau dieser Substrate in die einzelnen Bakterienarten. Wir können so Kinetiken bestimmen und den Stofffluss in der Gemeinschaft modellieren. Um nicht nur Interaktionen der Bakterien untereinander, sondern auch Wirts-Bakterien-Wechselbeziehungen aufzuklären, ha-ben wir begonnen, solche Studien auch in Zellkulturen und in Tiermodellen durchzuführen. Da die Materialien nicht radioaktiv sind, sind hier keine besonderen Sicherheits-maßnahmen erforderlich. Wir können an solchen Modellen zeigen, dass dieselben Bakterien in unterschiedlichen

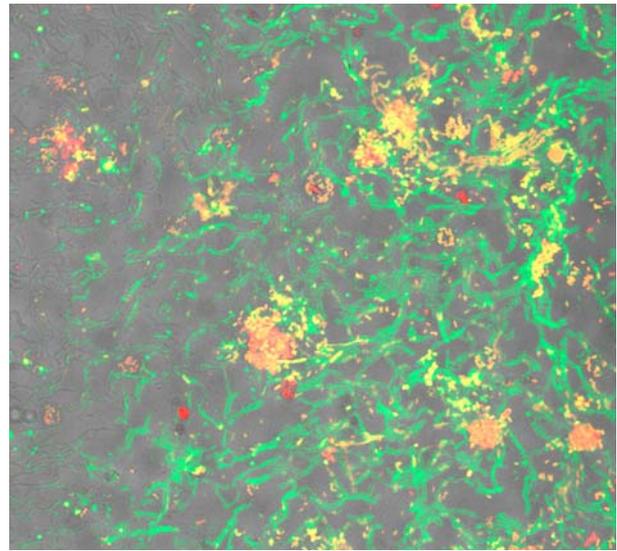


Bild einer Biofilm-Gemeinschaft, aufgenommen mit einem konfokalen Lasermikroskop. Die Zellen wurden mit Nilrot gefärbt, wobei leicht hydrophobe Bakterienzellen (rot) von stark hydrophoben (grün) unterschieden werden können

Foto: Ahmed Gebreil/ Maximiliano Gutierrez

Organen unterschiedliche Stoffwechselwege haben und in einem Organ z. B. die Glukose direkt aufnehmen, während sie sich in einem Tumor bevorzugt von dessen Stoffwechselprodukten ernähren.

Naturstoffe zur Kontrolle von Biofilmen Ziel dieser Unter-suchungen ist es, Biofilm-Gemeinschaften zu modulieren und pathogene Bakterien aus ihnen zu verdrängen. Wir set-zen dazu bekannte Naturstoffe ein, suchen aber auch nach neuen in Pilzen. Eine erste Untersuchung von Pilzisolaten ergab, dass eine Reihe recht unterschiedlicher Naturstoffe in der Lage sind, Biofilme pathogener Bakterien aufzulösen, ohne aber selbst antibiotisch zu wirken. Noch stehen diese Untersuchungen am Anfang, wir können aber dennoch bereits jetzt sagen, dass Pilze eine reiche Quelle für Verbindungen sind, die Biofilme modulieren können.

A. B. Estrela, M. G. Heck, W.-R. Abraham (2009) Novel approaches to control biofilm infections. *Curr. Med. Chem.*, 16, 1512-1530.

A. B. Estrela, W.-R. Abraham (2010) Combining biofilm controlling compounds and antibiotics as a promising new way to control biofilm infections. *Pharmaceuticals*, 3, 1374-1393.

W. Heuer, M. Stiesch, W. R. Abraham (2010) Microbial diversity of supra- and subgingival biofilms on freshly colonized titanium implant abutments in the human mouth. *European Journal of Clinical and Microbiological Infection Diseases*, <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-010-1068-y>



02.7 Metabolische Diversität

PROJEKTLEITER | Prof. Dr. Dietmar Pieper | Arbeitsgruppe Mikrobielle Interaktionen und Prozesse | dpi@helmholtz-hzi.de

PROJEKTMITARBEITER | Dr. Ramiro Vilchez | Dr. Melissa Wos | Macarena Marin | Daiana Morales | Amelia Silva

Mikroorganismen leben in ihren natürlichen Lebensräumen in komplexen Gemeinschaften, deren Zusammensetzung und Funktion stark von den Umgebungsbedingungen beeinflusst wird. Das Verständnis ihrer Funktion mit dem Ziel einer rationalen Beeinflussung und Nutzung ist nicht nur in marinen oder terrestrischen Ökosystemen wichtig. Auch der menschliche Körper ist von Bakterien in Mengen besiedelt, die die Zahl der menschlichen Zellen übersteigen. Diese wirtsassoziierten Mikroorganismen können für die menschliche Gesundheit vorteilhaft sein, stellen aber auch ein Reservoir für opportunistische Pathogene dar.

Gemeinschaften in der Nase Die menschlichen Nasenhöhlen sind die Hauptquelle und Risikofaktor für Infektionen durch *Staphylococcus aureus*, einen zunehmend multiresistenten Erreger, der für ein großes Spektrum von Infektionskrankheiten verantwortlich ist. Über die Zusammensetzung der nasalen Mikroflora und mögliche Wechselwirkungen zwischen Mitgliedern ist jedoch wenig bekannt. Wir haben nun die Zusammensetzung der Gemeinschaft von 40 Freiwilligen mittels neuer kultivierungsunabhängiger Methoden untersucht und das Vorhandensein von bisher nicht als dominant angenommenen Organismen wie *Fingoldia magna*, *Dolosigranulum pigrum*, *Anaerococcus sp.* oder bisher nicht kultivierten Actinomyceten nachgewiesen. Wir haben auch mögliche Wechselwirkungen zwischen *S. aureus* und anderen mikrobiellen Arten untersucht und, als Beispiel, eine statistisch signifikante negative Beziehung zwischen *S. aureus* und *F. magna* beobachtet, was darauf hinweist, dass diese Arten eine wesentlich unterschiedliche Verteilung haben und nicht die gleiche Nische besiedeln können. Diese bisher unbeschriebenen Co-Kolonisierungsmuster und Unterschiede in der Artenzusammensetzung liefern Erkenntnisse für zukünftige Interventionsstrategien zur Bekämpfung von Infektionen durch *S. aureus*.

Gemeinschaften des Darms Die Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft des menschlichen Darms (Mikrobiom) wird durch genetische Faktoren des Wirts und Umweltfaktoren bestimmt, wobei Veränderungen in der Struktur mit dem Ausbruch verschiedener Krankheiten in Verbindung gebracht wurden. Die Etablierung eines definierten menschlichen Darm-Mikrobioms in Nagetiermodellen bietet eine Möglichkeit, entsprechende Zusammenhänge zu untersuchen. Wir haben nun die Effektivität, Qualität und Stabilität des menschlichen Mikrobioms in keimfreien Ratten sowie Mäusen und in mit Antibiotika behandelten Mäusen verglichen. Hierbei wurden bemerkenswerte Unterschiede zwischen den verschiedenen Modellen beobachtet. Während die Mehrheit der dominanten menschlichen Spenderbakterien in keimfreien Ratten etabliert wurde, war nur ein Teil hiervon in keimfreien Mäusen nachweisbar. Insbesondere Mitglieder der Clostridien des Clusters IV, wichtige Buttersäureproduzenten, die zur Gesundheit des Darms beitragen, konnten die Maus nicht besiedeln. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die genetische Ausstattung des Empfängers die Wirksamkeit und Qualität der Übertragung der menschlichen Darmflora stark beeinflusst, und klären die Eignung der Modelle.

Umwelt-Gemeinschaften und neue Stoffwechselwege

Wir haben auch unsere analytischen Werkzeuge zur Analyse mikrobieller Gemeinschaften in kontaminierten Umwelten optimiert. Mittels eines neuartigen Genarrays zur schnellen Überwachung der Vielfalt und Menge an Genen des Schadstoffabbaus in Kombination mit metagenomischen Screeningmethoden konnte deren Struktur (auf DNA-Ebene) und Funktion (durch mRNA-Analyse) zuverlässig beschrieben werden. Diese kulturunabhängigen Analysen wurden durch die Aufklärung von neuen Stoffwechselwegen und neuartigen Enzymen ergänzt.

Scheithauer BK, Wos-Oxley ML, Ferslev B, Jablonowski H, Pieper DH. (2009). Characterization of the complex bacterial communities colonizing biliary stents reveals a host-dependent diversity. *ISME Journal* 3:797-807.

Wos-Oxley M, Plumeier I, von Eiff C, Taudien S, Platzer M, Vilchez-Vargas R, Becker K and Pieper DH. (2010). A poke into the diversity and associations within human anterior nares microbial communities. *ISME Journal* 4:839-851.

Brennerova MV, Josefova J, Brenner V, Pieper DH, Junca H. (2009). Metagenomics reveals diversity and abundance of meta-cleavage pathways in microbial communities from soil highly contaminated with jet fuel under air sparging bioremediation. *Environmental Microbiology* 11:2216-2227.

Vilchez-Vargas R, Junca H, Pieper DH. (2010). Metabolic networks, microbial ecology and 'omics' technologies: towards understanding in situ biodegradation processes. *Environmental Microbiology* 12:3089-3110.



03 Entzündung und Immunität

THEMENSPRECHER | Prof. Dr. Hansjörg Hauser | Abteilung für Genregulation und Differenzierung | hha@helmholtz-hzi.de

Die Folgen von Infektionen lösen beim Wirt starke Entzündungsreaktionen aus, welche zu Störungen des Immunsystems führen und gegebenenfalls große gesundheitliche Probleme zur Folge haben. Deshalb ist das Verständnis der Mechanismen, die durch die pathogenen Infektionen im Wirt hervorgerufen werden, von größtem Interesse. Dabei geht es sowohl um die pathogen-induzierten Schäden, als auch um das Auslösen der Abwehrreaktionen. Dieses Verständnis ist für die Entwicklung von prophylaktischen und therapeutischen Maßnahmen wichtig.

Dieses Topic beschäftigt sich mit pathogen-induzierten Reaktionen, zu denen die angeborene Immunabwehr, die Entzündung und die Aktivierung der erworbenen Immunität gehören. Zunächst werden diese Aspekte zum reinen Verständnis ihrer Mechanismen studiert. Des Weiteren wird großen Wert auf die Verwendung der Erkenntnisse zum Auffinden neuer Angriffspunkte für Medikamente und therapeutische Interventionsstrategien gesucht.

Die Induktion von Interferonen und ihren Aktivitäten

Interferone werden durch Pathogene über TLRs und zytosolische Rezeptoren induziert. Eine nachfolgende Signalkaskade führt zur transkriptionellen Induktion von Interferongen. Nach der Sekretion der Interferone üben diese diverse Aktivitäten in ihren Zielzellen aus. Die Ziele des Topics beinhalten das Verständnis der beteiligten Wirtsmoleküle, ihre Interaktion mit den viralen Komponenten, den Mechanismen der Signalweiterleitung und der Dynamik der Induktion in Abhängigkeit vom Zelltyp.

Folgen der Entzündung

Die Folgen von Entzündungen sind meist gutartiger Natur. Sie beinhalten im Wesentlichen Apoptose und Autophagie, um infizierte oder gestörte Zellen zu eliminieren. Ziel unserer Studien ist das Verständnis der zugrunde liegenden Wirtsmechanismen unter Berücksichtigung der Einflüsse durch das infizierende Pathogen. Eine der negativen Konsequenzen chronischer Entzündungen ist die Rheumatoide Arthritis. Eine wichtige Aktivität in diesem Topic betrifft die Unterdrückung der Rheumatoiden Arthritis durch Hemmung eines zentralen Signalmoleküls, wie in einem Mausmodell gezeigt werden konnte.

T-Zellen in Autoimmunität und Toleranz

T-Zellen sind wichtige Spieler bei der Entzündung und der Abwehr von Pathogenen. Während die gegen infizierte Zellen gerichtete T-Zell-vermittelte Immunität in der akuten Phase der Infektion äußerst wichtig ist, kann eine T-Zell-Aktivität auch zur Autoimmunität führen. Verschiedene Populationen von T-Zellen koordinieren die Balance zwischen Schutz und Zerstörung, Toleranz und (Auto)Immunität. Regulatorische T-Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Kontrolle dieser T-Zell-Immunität und der Aufrechterhaltung der immunologischen Toleranz. Die Entstehung von T-Zell-Populationen, ihre Homeostase und ihre Aktivität werden im Rahmen dieses Topics in Infektionsmodellen und genetischen Mausmodellen untersucht.

Systembiologie: Theoretische Modelle für immunologische Prozesse

In der Vergangenheit haben sich Forscher im Wesentlichen auf das Verständnis linearer Abläufe biologischer Aktivitäten konzentriert. Mit der Zugänglichkeit und Entwicklung verschiedener Datentypen sowie der Hochdurchsatztechniken ist klar geworden, dass diese Abläufe Teile komplexer Netzwerke sind. Es ist deshalb zunehmend schwieriger geworden, diese Daten in verständlichen Konzepten zu bündeln. Im Topic werden mathematische Modelle genutzt, um die Dynamik und die Komplexität immunologischer Vorgänge, insbesondere der B- und T-Zell-Homöostase und des Interferonsystems, zu beschreiben.



03.1 Entwicklung und funktionelle Eigenschaften von Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen

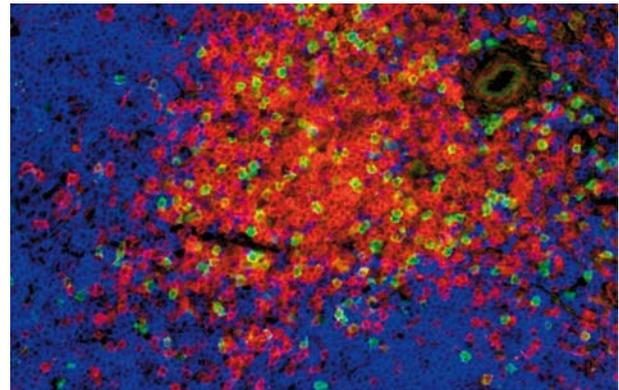
PROJEKTLEITER | Prof. Dr. Jochen Hühn | Abteilung für Experimentelle Immunologie | jhu08@helmholtz-hzi.de

PROJEKTMITARBEITER | Pedro Almeida | Devesha Bhagwat | Sascha Cording | Dr. Stefan Flöß | Larissa Fournier | Yi-Ju Huang | Dr. Katjana Klages | Dr. Julia Polansky | Lisa Schreiber | Dr. René Teich | Aras Tokar

Regulatorische T-Zellen (Tregs) spielen eine zentrale Rolle für die Kontrolle einer Vielzahl von Immunreaktionen und die Aufrechterhaltung von immunologischer Toleranz. CD4⁺ Tregs sind durch die Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3 gekennzeichnet, der sowohl für die Entstehung der Tregs als auch für deren suppressorische Eigenschaften eine wesentliche Bedeutung hat. Die Mehrzahl der Foxp3⁺-Tregs wird schon während der Reifung der T-Zellen im Thymus gebildet und zeigt Eigenschaften einer stabilen T-Zelllinie. Wir konnten kürzlich zeigen, dass epigenetische Modifikationen innerhalb einer evolutionär konservierten Region des Foxp3-Gens für die Stabilität der Foxp3-Expression von entscheidender Bedeutung sind (Huehn et al., 2009). Diese epigenetischen Modifikationen werden schon während der Reifung der Tregs im Thymus initiiert. Erst durch die epigenetischen Modifikationen wird die evolutionär konservierte Region aktiviert und kann durch spezifische Transkriptionsfaktoren gebunden werden (Polansky et al., 2010), so dass diese Modifikationen als eine Art molekularer Schalter angesehen werden können.

Foxp3⁺-Tregs reifen nicht nur im Thymus. Es wurde auch beschrieben, dass die Antigenerkennung unter tolerogenen Bedingungen zur *de novo* Induktion von Foxp3⁺-Tregs aus konventionellen, naiven T-Zellen führt. Wir konnten zeigen, dass eine besonders effiziente *de novo* Induktion in Mukosa-assoziierten lymphatischen Geweben stattfindet und dass dabei die Stromazellen der Lymphknoten eine entscheidende Rolle spielen. Derzeit wollen wir herausfinden, wie es zur ‚Tolerisierung‘ der Stromazellen innerhalb der Mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebe kommt. Darüber hinaus untersuchen wir, ob die innerhalb der Mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebe *de novo* induzierten Foxp3⁺-Tregs besonders effizient die Entstehung von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen verhindern können.

Foxp3⁺-Tregs können auch sehr effizient gewünschte Immunreaktionen supprimieren; in einer großen Zahl von Tumorpatienten und in verschiedenen *in vivo* Tumormodellen konnte eine präferentielle Akkumulation von Foxp3⁺-Tregs innerhalb der Tumore beobachtet werden. Derzeit untersuchen wir, zu welchem Anteil diese Akkumulation durch spezifische Rekrutierung, durch lokale Expansion sowie durch *de novo* Induktion von Foxp3⁺-Tregs innerhalb des Tumors erklärt werden kann. In jedem Fall verhindert die große Zahl an Foxp3⁺-Tregs innerhalb des Tumors sehr effizient die Entstehung einer tumorspezifischen Immunantwort. Mit Hilfe einer transgenen Maus, welche die selektive Depletion von Foxp3⁺-Tregs erlaubt, haben



Foxp3⁺-Zellen in der Milz: Die Zellen wurden durch Fluoreszenzgekoppelte Antikörper bestimmt. B-Zellen, T-Zellen und Foxp3⁺-Zellen sind jeweils blau, rot und grün gefärbt.

Foto: Dr. Eberl, Pasteur Institute, Paris, France.

wir zeigen können, dass die transiente Eliminierung der Foxp3⁺-Tregs unter therapeutischen Bedingungen zu einer Reaktivierung der tumorspezifischen Immunantwort führt. Eine besonders starke Regression des Tumorwachstums konnte beobachtet werden, wenn wir zeitgleich mit der Eliminierung der Foxp3⁺-Tregs eine Vakzinierung gegen Tumorzellantigene durchführten. In zukünftigen Projekten werden wir nach Wegen suchen, Foxp3⁺-Tregs entweder selektiv zu eliminieren oder ihre suppressorische Aktivität transient zu inhibieren. Diese Untersuchungen sind auch für die Entwicklung von Vakzinierungsstrategien gegen chronische Infektionen von großem Interesse.

Insgesamt erwarten wir von unseren Untersuchungen nicht nur ein besseres molekulares Verständnis von der Entwicklung der Foxp3⁺-Tregs, sondern auch wesentliche Erkenntnisse über ihre *in vivo* Eigenschaften. Dies wird uns neue Möglichkeiten für die Induktion und Modulation von Tregs im Rahmen therapeutischer Ansätze eröffnen.

Klages, K., C.T. Mayer, K. Lahl, C. Loddenkemper, M.W. Teng, S.F. Ngiew, M.J. Smyth, A. Hamann, J. Huehn*, and T. Sparwasser*. (2010) Selective depletion of Foxp3⁺ regulatory T cells improves effective therapeutic vaccination against established melanoma. *Cancer Research* 70:7788-7799. *equally contributed

Polansky, J.K., L. Schreiber, C. Thelemann, L. Ludwig, M. Krüger, R. Baumgrass, S. Cording, S. Floess, A. Hamann, and J. Huehn. (2010) Methylation matters: Binding of Ets-1 to the demethylated Foxp3 gene contributes to the stabilization of Foxp3 expression in regulatory T cells. *Journal of Molecular Medicine* 88:1029-1040.

Huehn, J., J.K. Polansky, and A. Hamann. (2009) Epigenetic control of FOXP3 expression: the key to a stable regulatory T-cell lineage? *Nature Reviews in Immunology* 9:83-89.



03.2 Mukosale Immunität und Entzündung

PROJEKTLEITER | Priv.-Doz. Dr. Dunja Bruder | Arbeitsgruppe Immunregulation | dbr@helmholtz-hzi.de

PROJEKTMITARBEITER | Andrea Autengruber | Harro Frauendorf | Dr. Marcus Gereke | Dr. Andreas Jeron | Dr. Sabine Stegemann | Dr. Milena Tosiek | Julia Volckmar

Wir erforschen grundlegende Mechanismen T-Zell-vermittelter Entzündung in mukosalen Grenzflächen, die Mechanismen der peripheren Toleranzinduktion sowie den Einfluss von Infektionen auf das immunologische Gleichgewicht zwischen Toleranz und Autoimmunität. Weitere Schwerpunkte sind die Pathogen-induzierte Immunmodulation bei bakteriellen und viralen Atemwegsinfektionen sowie eine therapeutische Vakzinierung gegen das Hepatitis C Virus.

Toleranz, Autoimmunität und Infektion Wir untersuchen die T-Zell-vermittelte Reaktivität gegen Selbstantigene in der Lunge in einem transgenen Mausmodell, das auf der Expression des Influenza Hämagglutinins (HA) in alveolaren Typ II Epithelzellen (AECII) der Lunge basiert. Erkennen HA-spezifische CD4⁺ T-Zellen in der Lunge das Selbstantigen, führt das zu einer chronisch obstruktiven Lungenerkrankung. Dies geht mit der vermehrten Entstehung Foxp3⁺ regulatorischer CD4⁺ T Zellen (Tregs) einher, die dann Immunreaktionen in der entzündeten Lunge dämpfen. Diese Zellen sezernieren immunsuppressive Faktoren wie TGF-β oder IL-10, die direkt Tregs induzieren. Darüber hinaus exprimieren AECII aus der entzündeten Lunge Oberflächenmoleküle, die komplementär zu Rezeptoren auf Tregs sind, sowie vermehrt auch antivirale Gene, welches den Verlauf von Infektionen beeinflussen könnte.

Während HA-Antigenerkennung in der Lunge durch CD4⁺ T-Zellen Tregs induziert, sind selbstreaktive CD8⁺ T-Zellen aus der entzündeten Lunge weder aktiviert noch regulatorisch. Einige HA-spezifische CD8⁺ T-Zellen sind jedoch Memory-Zellen. Die Entfernung der Tregs führt nicht zu einer effizienten Reaktivierung der CD8⁺ T-Zellen, d.h. andere Toleranzmechanismen müssen aktiv sein: CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-vermittelte Erkrankungen werden unterschiedlich reguliert.

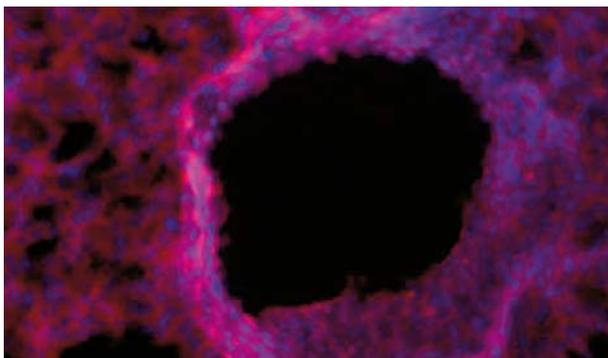


Abb. 1. Alveole einer Mäuselunge. Blau: DAPI; rot: Tubulin

Foto: HZI&SySy GmbH, Christian Erck

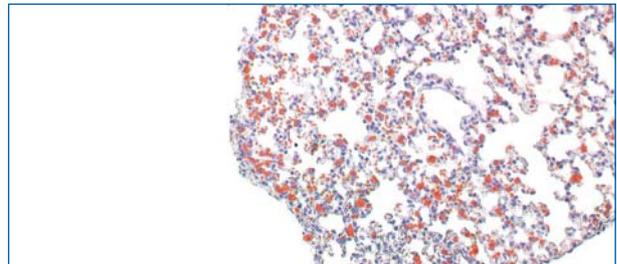


Abb. 2. Identifizierung von alveolaren Typ II Epithelzellen (AECII) in den Alveolen einer Mäuselunge anhand einer Surfactant Protein-C Färbung (in rot) als typisches A Markerprotein. Foto: MHH, Christian Hennig&Jana Bergmann

Bei Mäusen mit der Veranlagung für Typ 1 Diabetes bricht Diabetes nach einer *Listeria monocytogenes*-Infektion umgehend aus. Vermutlich wird die Funktion regulatorischer T-Zellen gestört – in Abhängigkeit von Listeriolysin O. Wir wollen klären, ob die Infektion selbst für den Verlust immunologischer Toleranz verantwortlich ist.

Immunmodulation im Kontext von respiratorischen Infektionen

Pathogene wie *Bordetella bronchiseptica* modulieren die Immunantwort des Wirtes und tragen so zur Entstehung von Persistenz bei. Gemeinsam mit C. Guzman untersuchen wir den Einfluss chronischer *B. bronchiseptica*-Infektionen auf die Plastizität von Tregs. Tregs aus chronisch infizierten Mäusen exprimieren u.a. vermehrt Neuropilin-1, einen aktivierungsunabhängigen Marker für Tregs. Derzeit untersuchen wir den Zusammenhang mit Unterschieden in der Treg-Funktion.

In einem Influenza A / *Streptococcus pneumoniae* Superinfektionsmodell der Maus untersuchen wir die Mechanismen hinter der erhöhten Sterblichkeit der Mäuse durch *S. pneumoniae* induzierte Sepsis – nach einer Primärinfektion mit dem Influenza-Virus. Die erhöhte Anfälligkeit gegenüber Pneumokokkeninfektion entsteht nicht durch eine Toll-like receptor (TLR)-7 induzierte Lymphopenie. TLR-7 abhängige Signalwege regulieren jedoch die antivirale Immunantwort. In TLR-7 defizienten Mäusen beeinflusst dieser Rezeptor für virale RNA den Verlauf der bakteriellen Superinfektion.

HCV Infektionen der Leber sind die Hauptursache für das Leberzellkarzinom. Im HGF-finanzierten Verbundprojekt „Immunotherapy of Cancers“ entwickeln wir eine therapeutische Vakzinierung gegen HCV auf Basis des *in vivo* Targeting von HCV Antigenen zu Dendritischen Zellen. Diese Methode induziert sowohl CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellantworten als auch hohe Antikörpertiter.

03.3 Immuneffektoren: Moleküle, Zellen und Mechanismen

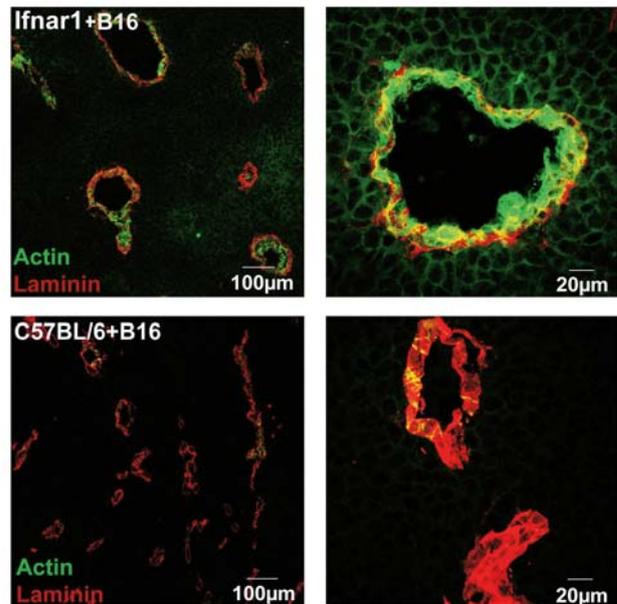
PROJEKTLEITER | Dr. Siegfried Weiss | Arbeitsgruppe Molekulare Immunologie | siw@helmholtz-hzi.de

PROJEKTMITARBEITER | Imke Bargen | Nicole Dietrich | Dr. Sandra Düber | Dr. Nelson Gekara | Dr. Jadwiga Jablonska | Katja Kochrübe | Dr. Sara Leschner | Dr. Stefan Lienenklaus | Dr. Bishnudeo Roy | Swati Shukla | Evgeniya Solodova | Christian Stern | Dr. Nuno Viegas | Kathrin Wolf | Natalia Zietara

Unser Immunsystem setzt sich aus mehreren Verteidigungslinien zusammen. Eine der ersten Linien sind die Typ-I-Interferone (IFN), mit ihren wichtigsten Vertretern IFN- α und IFN- β . Sie haben antivirale Eigenschaften, werden jedoch auch bei vielen anderen Infektionen induziert und spielen bei normalen physiologischen Vorgängen eine wichtige Rolle. Wir konnten zeigen, dass auch Liganden des Toll-like-receptors 2 (TLR2) Makrophagen IFN induzieren können. TLR2 Liganden findet man auf Gram-positiven Bakterien oder auf Mykoplasmen. Interessanterweise muss der TLR2 von den Makrophagen endozytiert werden, um IFN-Produktion auszulösen. Wird die Endozytose blockiert, so dass der TLR2-Liganden Komplex an der Zelloberfläche bleibt, wird nur die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, wie TNF- α , aktiviert. Also entscheidet die Fähigkeit einer Zelle, TLRs nach Ligandenbindung zu endozytieren, darüber, ob bei der Zelle IFN-Produktion über diese TLRs induziert werden kann. Wir konnten dabei zeigen, dass Mastzellen entsprechende TLRs nicht endozytieren und auch keine Bakterien phagozytieren können. Dadurch können sie auf Bakterieninfektionen nicht mit IFN-Produktion antworten – bei Virusinfektionen dagegen sehr wohl. Mastzellen sind anatomisch hauptsächlich unter den verschiedensten Epithelien angesiedelt. Sie stellen deshalb die ersten Immunzellen dar, die mit eindringenden Krankheitserregern in Berührung kommen. Bei Bakterieninfektionen ist die Produktion von IFN häufig schädlich. Dass die Mastzellen unter diesen Umständen nur proinflammatorische Zytokine und kein IFN produzieren können, könnte deshalb einen wohl ausgewogenen Abwehrmechanismus darstellen.

Wir haben beobachtet, dass bei Mäusen, bei denen das IFN- β Gen inaktiviert wurde oder bei denen das Gen einer der Ketten des IFN-Rezeptors (IFNAR) deletiert wurde, die Bildung von Blutgefäßen verändert ist. Dies war in schnell wachsenden Tumoren besonders auffällig: In Mäusen ohne IFN- β oder IFNAR wuchsen die Tumore wesentlich schneller. Der Grund ist eine verstärkte Angiogenese, so dass mehr und besser ausgebildete Blutgefäße in den Tumoren vorhanden waren. Dafür verantwortlich sind neutrophile Granulozyten (Abb. 1). Ohne funktionierendes IFN-System waren wesentlich mehr dieser Granulozyten in den Tumor eingewandert, und sie produzierten verstärkt Zytokine, die die Blutgefäßbildung unterstützen. Mit Granulozyten aus den Tumoren konnten wir zeigen, dass bereits geringe Mengen an IFN- β die Produktion der Blutgefäß-bildenden Faktoren herunter regulieren. Damit ist IFN ein wesentlicher Bestandteil des Überwachungssystems gegen Krebs.

Viele Bakterien, wie auch *Salmonella typhimurium*, reichern sich in festen Tumoren an. Wir können sie somit nutzen, um therapeutische Moleküle direkt im Tumor zu exprimieren



Verstärkte Angiogenese und Tumorwachstum, unterstützt durch neutrophile Granulozyten mit defekter IFN Signaltransduktion. Mäusen wurden subkutan B16F10 Melanomzellen injiziert, die entweder mit Neutrophilen von Tumor-tragenden Ifnar1^{-/-} Mäusen (IFNAR^{-/-}+B16) oder mit Neutrophilen von Tumor-tragenden Wildtyp Mäusen (C57BL/6+B16) gemischt waren. Tumore, die mit Neutrophilen gemischt waren, deren IFN Signaltransduktion zerstört war, wuchsen wesentlich schneller als die Kontrolltumore. Die immunhistologische Analyse für die Endothelzellen mit anti-Laminin (rot) und für Zellen mit glatter Muskulatur mit anti-Aktin (grün) zeigte eine wesentlich verstärkte Anwesenheit von glatten Muskelzellen in den IFNAR^{-/-}+B16 Tumoren. Dies ist indikativ für einen höheren Reifungsgrad der Blutgefäße und damit eine bessere Blutversorgung des Tumors. Foto: HZI

und damit das gesunde Gewebe zu schonen. Nötig sind dafür bakterielle Promotoren, die die Expression der therapeutischen Moleküle auf den Tumor beschränken. Dazu haben wir mit unseren Salmonellen eine sogenannte Promotor-Trap-Bibliothek untersucht und dabei mehrere Promotoren gefunden, die Tumor-spezifische Expression zeigten. Derzeit werden diese Promotoren bioinformatisch und experimentell charakterisiert. Parallel dazu haben wir Tumor-spezifische Genexpression mit Hilfe von Expressionsarrays untersucht. Wir haben über 20 bakterielle Gene definiert, die spezifisch im Tumor und nicht in der Milz exprimiert werden. Dies sollte zu einem besseren Verständnis der Physiologie der Bakterien im Tumor führen und weiterhin zu Kontrollelementen, die ermöglichen, dass therapeutische Moleküle spezifisch im Tumor exprimiert werden können.



03.4 Das Interferonsystem in antiviraler Abwehr und Immunität

PROJEKTLEITER | Dr. Andrea Kröger | Abteilung für Genregulation und Differenzierung | akg@helmholtz-hzi.de

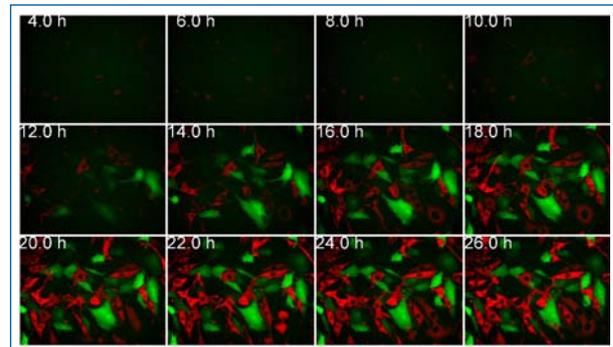
PROJEKTMITARBEITER | Katja Finsterbusch | Lucas Kemper | Dr. Mario Köster | Antje Ksienzyk | Ramya Nandakumar | Berit Neumann | Dr. Ulfert Rand

Interferone (IFN) sind zentrale Signalmoleküle bei der Abwehr von Pathogenen und erfüllen essenzielle Funktionen in der Kommunikation von Zellen des Immunsystems. Das IFN-System bildet die erste Verteidigungslinie des Körpers im Kampf gegen Infektionen. Die Wirkung beruht dabei auf der transkriptionellen Aktivierung einer Vielzahl antiviral und immunmodulatorisch wirkender Gene. Wir wollen molekulare und zelluläre Zusammenhänge der Wirtsabwehr gegen Infektionen verstehen und den Einfluss des IFN-Systems auf die Immunität untersuchen. Das detaillierte Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen und deren zeitliche und räumliche Dynamik können zu neuen Erkenntnissen für die Prävention und Therapie von Infektionen führen.

Das IFN-Netzwerk Das Netzwerk aus IFN-Produktion und -Wirkung ist quantitativ und temporär strikt reguliert, da eine Deregulation zu gravierenden pathologischen Bedingungen führt. Wir haben mittels intrazellulärer Reporter dynamische Zusammenhänge auf unterschiedlichen Stufen des Netzwerks auf der Ebene von Einzelzellen untersucht. Wir konnten zeigen, dass die initiale Induktion von IFN ein hoch stochastischer Prozess ist, während die Reaktion auf IFN bimodal verläuft. Basierend auf diesen Daten wurde ein quantitatives mathematisches Modell zur Dynamik der IFN-Systems entwickelt. Es erlaubt Voraussagen über den Ausgang von Infektionen. Um die koordinierten Funktionen des IFN-Netzwerks *in vivo* zu untersuchen, wurden Reporter-Mäuse hergestellt, an denen wir die Ausbreitung des IFN-Signals und das zelluläre Wirkungsspektrum untersuchen. So konnten wir zeigen, dass Viren mit unterschiedlicher Pathogenität veränderte IFN-Reaktionen in Qualität, Quantität und zeitlicher Abfolge auslösen.

Ausfallsicherung für die Abwehr von Virusinfektionen

Viren haben Strategien entwickelt, das IFN-System zu umgehen – und dadurch der Bekämpfung durch den Wirt zu entgehen. Wir konnten einen alternativen Mechanismus der Virusabwehr identifizieren, der unabhängig vom IFN-System wirkt. Die zentrale Rolle hierbei spielt der Transkriptionsfaktor IRF-1. Mäuse, denen das IRF-1-Gen fehlt, können virale Infektionen schlechter kontrollieren. Wenn Viren Zellen infizieren, kommt es durch IRF-1 zu einer antiviralen Abwehrreaktion. Mit Viperin konnten wir ein Gen identifizieren, das an diesem Mechanismus entscheidend beteiligt ist. Bei viralen Infektionen wirkt IRF-1 einerseits als Verstärker der IFN-Antwort und andererseits als



Signalprogression während einer Virusinfektion

Time-lapse-Mikroskopie der IFN Induktion (grün) und der Antwort auf IFN (rot) zeigt die räumliche und zeitliche Dynamik der IFN-Signalausbreitung. Foto: HZI

Ausfallsicherung des IFN-Systems. Die Wirkung dieses IFN-unabhängigen Mechanismus soll in weiteren Infektionsmodellen wie HCV untersucht werden.

IRF-1 stimuliert die angeborene und erworbene Immunität

Neben der antiviralen Abwehr ist das IFN-System wichtig für die Stimulation von Immunantworten. Erhöhte Immunzellaktivität spielt bei der Abwehr von Tumoren eine wichtige Rolle. Die Expression von IRF-1 in einem Lungenmetastasen-Modell verhindert die Bildung von Metastasen. Wir konnten dies auf die Anlockung und Aktivierung von natürlichen Killerzellen zurückführen. Gleichzeitig führt die Expression von IRF-1 zur Etablierung einer Tumorspezifischen CD8⁺ T-Zell-Antwort, die vor der Entstehung von sekundären Tumoren schützt. Bei der Induktion und Aktivierung von Immunzellen spielt die entzündliche Mikroumgebung eines Tumors eine wichtige Rolle. Detaillierte Analysen der Mikroumgebung und der Signalkaskaden der Immunzellen sollen in Zukunft klären, wie es zur Induktion von Immunantworten kommt.

Stirnweiss, A., Ksienzyk, A., Klages, K., Rand, U., Grashoff, M., Hauser, H., Kröger, A. (2010) IFN regulatory factor-1 bypasses IFN-mediated antiviral effects through viperin gene induction. *Journal of Immunology* **184**(9), 5179-5185.

Pulverer, J.E., Rand, U., Lienenklaus, S., Kugel, D., Zietara, N., Kochs, G., Naumann, R., Weiss, S., Staeheli, P., Hauser, H., Köster, M. (2010) Temporal and spatial resolution of type I and III interferon responses *in vivo*. *Journal of Virology* **84**(17), 8626-8638.

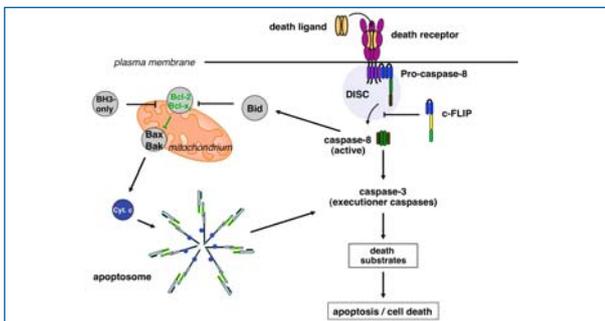
Dietrich, N., Rohde, M., Geffers, R., Kröger, A., Hauser, H., Weiss, S., Gekara, N.O. (2010) Mast cells elicit proinflammatory but not type I interferon responses upon activation of TLRs by bacteria. *Proceedings of National Academy of Science USA* **107**(19):8748-8753.

03.5 Zelltodmechanismen im Immunsystem

PROJEKTLEITER | Prof. Dr. Ingo Schmitz | Arbeitsgruppe System-orientierte Immunologie und Entzündungsforschung | isc09@helmholtz-hzi.de

PROJEKTMITARBEITER | Michaela Annemann | Frida Ewald | Ralf Höcker | Dr. Yvonne Rauter | Marc Schuster | Tanja Telieps

Formen des Zelltodes Im Laufe der Evolution haben multizelluläre Organismen verschiedene Zelltodmechanismen entwickelt. Sie können je nach Stimulus und Zelltyp induziert werden und erlauben Feinabstimmungen der Zellantwort auf externe Umwelteinflüsse. So ist die Nekrose durch ein starkes Anschwellen der Zelle gekennzeichnet. Die Zelle platzt und intrazelluläre Bestandteile werden in das umliegende Milieu freigesetzt. Diese induzieren die Aktivierung von Immunzellen und lösen so eine proinflammatorische Immunantwort aus. Im Gegensatz zur Nekrose wird bei der Apoptose die Integrität der Plasmamembran der absterbenden Zelle gewahrt und so eine Freisetzung intrazellulärer Bestandteile und damit eine Überaktivierung des Immunsystems verhindert. Apoptose spielt eine wichtige Rolle beim Wechselspiel zwischen Pathogenen und der Wirtszelle. Zum Beispiel töten Immunzellen infizierte Gewebszellen durch



Der intrinsische Signalweg kann durch verschiedene Stimuli, wie zum Beispiel UV-Bestrahlung oder den Entzug von Wachstumsfaktoren, ausgelöst werden. Pro-apoptotische BH3-only Proteine werden daraufhin aktiviert und können antiapoptotische Bcl-2 Proteine inhibieren. Dies führt zu einer Bak/Bax-vermittelten Porenbildung in der äußeren Mitochondrienmembran, so dass apoptogene Faktoren wie z.B. Cytochrom c aus dem mitochondrialen Intermembranraum freigesetzt werden. Letzteres induziert durch seine Bindung an monomeres Apaf-1 die Bildung eines heptameren Multiproteinkomplexes, dem Apoptosom, über das Caspase-9 aktiviert werden kann. Aktive Caspase-9 kann nun ihrerseits Caspase-3 proteolytisch aktivieren. Durch die anschließend massive Spaltung zellulärer Todessubstrate wird letztendlich der Tod der Zelle ausgelöst. Der extrinsische Apoptose-Signalweg verläuft über die Aktivierung membranständiger Todesrezeptoren. Bei Bindung des spezifischen, trimeren Liganden wird eine Oligomerisierung des Rezeptors und die Bildung des DISCs, bestehend aus der zytoplasmatischen Domäne des Todesrezeptors, dem Adapterprotein FADD sowie Procaspase-8 induziert. Diese kann direkt Caspase-3 oder über die Spaltung des BH3-only Proteins Bid zu tBid den intrinsischen Signalweg aktivieren. Die Aktivierung von Caspase-8 am DISC kann durch c-FLIP Proteine inhibiert werden.

Apoptose ab, um eine weitere Vermehrung der Pathogene zu unterbinden. Andererseits können bestimmte Viren und Bakterien die Apoptose in der Wirtszelle unterbinden, um ihr Überleben zu sichern. Deregulation von Apoptose ist eng mit dem Auftreten verschiedener Erkrankungen assoziiert. So sterben bei der viralen Hepatitis zu viele Zellen an Apoptose, wohingegen in Tumorzellen die Apoptose inhibiert ist.

Signalwege der Apoptose Es wurden zwei Hauptsignalwege der Apoptose beschrieben, der extrinsische und der intrinsische Signalweg. Der intrinsische Weg involviert das Mitochondrium und wird durch die Bcl-2-Familie reguliert. Extrinsische Apoptose wird durch sogenannte Todesrezeptoren ausgelöst, deren prototypischer Vertreter CD95 ist. CD95 ist für eine Reihe von immunologischen Prozessen wichtig, wie z.B. T-Zell-vermittelte Immunantworten, aber auch bei der Tumorentstehung. Über die Signalmechanismen der Apoptose bei akuten und chronischen Infektionen ist wenig bekannt. Wir wollen diese mit Hilfe von verschiedenen transgenen Mausmodellen und pharmakologischen Apoptose-Modulatoren (z.B. Caspase-Inhibitoren) aufklären. Dabei werden wir uns u.a. auf die FLICE-inhibitorischen Proteine (FLIP) konzentrieren, die wichtige Regulatoren von Todesrezeptoren sind. FLIP-Proteine wurden in Säugetierzellen (zelluläre FLIP = c-FLIP) und in bestimmten γ -Herpesviren (v-FLIP) identifiziert. Wir konnten zeigen, dass die c-FLIP- und v-FLIP-Proteine unterschiedliche biochemische Mechanismen nutzen, um Apoptose zu inhibieren, obwohl sie strukturell sehr ähnlich sind. Die funktionellen Konsequenzen und therapeutischen Möglichkeiten dieser Unterschiede sollen in Zukunft untersucht werden.

Autophagie Autophagie ist ein lysosomaler Abbaumechanismus und essenziell für die zelluläre Homöostase, die embryonale Entwicklung und Immunität. Einerseits können intrazelluläre Pathogene über Autophagie eliminiert werden. Andererseits nutzen bestimmte Pathogene die Autophagie aus, um dem Immunsystem zu entkommen. Obwohl die Funktion vieler molekularer Mediatoren der Autophagie in den letzten Jahren aufgeklärt wurde, ist wenig über die Signalmechanismen bekannt, die die Autophagie regulieren. Wir haben vor kurzem einen neuen Regulationsmechanismus entdeckt, der die Stresskinase p38 und Atg5 involviert, einen essenziellen Autophagie-Mediator. In Zukunft wollen wir die Rolle dieses Regulationsmechanismus beim Überleben von *Staphylococcus aureus* in Säugetierzellen untersuchen.

Ueffing N, Keil E, Freund C, Kühne R, Schulze-Osthoff K, Schmitz I (2008) "Structural and mutational analyses of c-FLIP^{short}, the only murine short FLIP isoform, reveal requirements for DISC recruitment". *Cell Death and Differ* 15(4):773-82.

Ueffing N, Schuster M, Keil E, Schulze-Osthoff K, Schmitz I (2008) "Upregulation of c-FLIP^{short} by NFAT contributes to apoptosis resistance of short-term activated T cells". *Blood* 112(3):690-8.



03.6 Inflammation und Regeneration

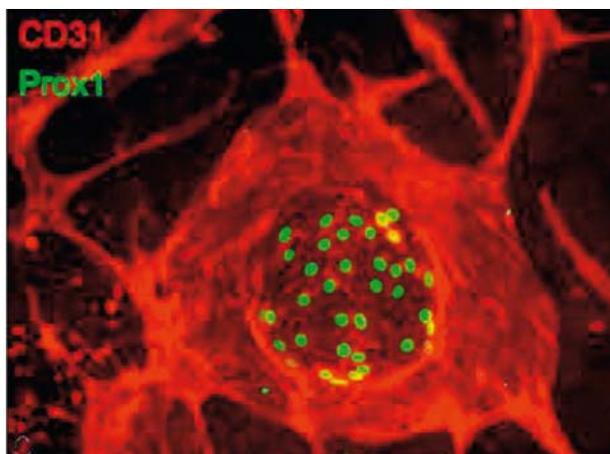
PROJEKTLEITER | Priv.-Doz. Dr. Gerhard Gross | Abteilung für Genregulation und Differenzierung | ggr@helmholtz-hzi.de

PROJEKTMITARBEITER | Dr. Thomas Böldicke | Markus Heine | Sandra Laggies | Dr. Virginia Seiffart | Stefan Somplatzki | Lijing Sun | Dr. Herbert Weich | Dr. Manfred Wirth

Die Infektion von Geweben, sowie Sepsis, Trauma und Schock induzieren teilweise schwere Entzündungen im Organismus. Solche akuten Entzündungen sollen eigentlich dazu führen, dass infektiöse Pathogene wie Bakterien oder Viren eliminiert werden, eine Geweberegeneration initiiert und der Organismus wieder zur normalen Funktion zurückführt wird. Häufig gehen akute Entzündungen jedoch in eine chronische Form über – Zellen des Immunsystems zerstören das Gewebe am Ort der Entzündung dann so weit, dass es häufig nicht mehr regenerierbar ist.

Wir folgen der Hypothese, dass eine Inhibierung entzündlicher Signalkaskaden die Grundlage neuer anti-entzündlicher Strategien zur Therapie akuter und chronischer Entzündungen werden kann. Dazu untersuchen wir Caveolin-1 als neues Zielprotein – für Entzündungen und Infektionen durch Influenzaviren. Caveolin-1 ist ein Membranprotein, das vor allem am Molekültransport und an zellulären Signaltransduktionsprozessen beteiligt ist. Es interagiert mit dem Matrixprotein M2 humaner Influenzaviren und beeinflusst die Produktion der viralen Nachkommenschaft. Diese Caveolin-1/M2 Interaktion und ihre Signalwege werden nun auf ihr Potenzial als neues Target für die therapeutische Intervention hin untersucht.

Als weitere neue antiinflammatorische Strategie stellen wir spezifische Intrabodies her, die entzündliche Rezeptoren wie Toll-like Receptor 2 oder 9 (TLR-2/TLR9) inhibieren können, indem sie diese im endoplasmatischen Retikulum inaktiv zurückhalten. Wir konnten zeigen, dass der anti-TLR2-In-



In vitro Differenzierung endothelialer Vorläuferzellen (EPCs) aus der Mauslunge: Bipotenz zur Differenzierung in Blut- und Lymphendothelzellen. (Prox1, Lymphendothelzellmarker (grün); CD31, Blut- und Lymphendothelzellmarker (rot)) Foto: HZI

trabody septischen Schock in Mäusen inhibieren kann. Wir untersuchen nun anti-TLR2 sowie den neu hergestellten anti-TLR9 Intrabody in einem Mausmodell auf ihre Fähigkeit, mit einer schweren chronischen Entzündung wie rheumatoider Arthritis zu interferieren.

Die rheumatoide Arthritis ist eine schwere chronische – sehr schmerzhafte – Autoimmunerkrankung, die langfristig häufig die Gelenke zerstört. Die Krankheit betrifft 1% der Bevölkerung und ist durch Invalidität und erhöhte Mortalität gekennzeichnet. Aktuelle Therapien sind nur begrenzt wirksam, damit ist die Suche nach neuen Therapiestrategien ein wichtiges Ziel der Rheumaforschung. In unserem neuen Ansatz blockieren wir die Funktion eines zentralen inflammatorischen Signalmoleküls (TGF-beta-aktivierte Kinase-1; TAK1) im Gesamtorganismus mithilfe von kleinen, inhibitorischen Molekülen, den sogenannten siRNAs. Im Mausmodell zeigte sich eine hervorragende therapeutische Wirkung dieser „anti-TAK1 Strategie“, die mit stark verminderten Gelenkdegenerationen und Entzündungsreaktionen einherging. Die Inhibierung von TAK1 hat zudem eine reduzierte Anzahl von inflammatorischen T-Helferzellen (sog. Th1 und Th17 Zellen) zur Folge. TAK1 bietet demnach ein potenzielles neues Ziel in der Behandlung von rheumatoider Arthritis. Diese Ergebnisse sollen nun auf andere chronisch-inflammatorische Prozesse übertragen werden.

Blut- und Lymphgefäße sind wichtig für die Aufrechterhaltung chronischer Entzündungen aber auch für das Abklingen von Entzündungen. Um deren Rolle sowie Interaktionen zwischen Lymphgefäßen und entzündeten Geweben zu untersuchen, haben wir neue Techniken entwickelt: Wir isolieren humane Lymphendothelzellen aus gesundem und erkranktem Gewebe junger Patienten mit einem Lymphangiom und charakterisieren das Genexpressionsmuster.

Zusätzlich konnten für experimentelle Modelle und Studien endotheliale Vorläuferzellen aus der Mauslunge isoliert werden, die *in vitro* und *in vivo* zu Blut- und Lymphendothelzellen ausdifferenzieren können. Wir untersuchen gegenwärtig, welche Gene sich als mögliche Targets für therapeutische Entwicklungen anbieten.

Becker, J., Pavlakovic, H., Ludewig, F., Wilting, F., Weich, H.A., Albuquerque, R., Ambati, J., & Wilting, J. (2010) Neuroblastoma progression correlates with downregulation of the lymphangiogenesis inhibitor sVEGFR-2. *Clinical Cancer Research* 16, 1431-1441.

Charbord, P., Livne, E., Gross, G., Haupl, T., Neves, N. M., Marie, P., Bianco, P., & Jorgensen, C. (2010) Human bone marrow mesenchymal stem cells: A systematic reappraisal via the genostem experience. *Stem Cell Review*, in press

Courties, G., Seiffart, V., Presumey, J., Escriou, V., Scherman, D., Zwerina, J., Riuz, G., Zietara, N., Jablonska-Koch, J., Weiss, S., Hoffmann, A., Jorgensen, C., Apparailly, F., & Gross, G. (2010) In vivo RNAi-mediated silencing of TAK1 decreases inflammatory Th1 and Th17 cells through targeting of myeloid cells. *Blood*, in press.



03.7 Zelluläre Modelle für die Infektion

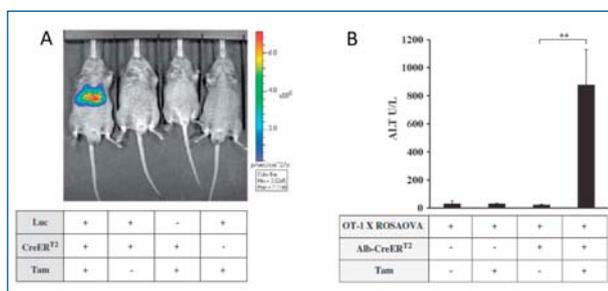
PROJEKTLEITER | Dr. Dagmar Wirth | Arbeitsgruppe Modellsysteme für Infektion und Immunität | dkl@helmholtz-hzi.de

PROJEKTMITARBEITER | Muhammad Badar | Lacramioara Botezatu | Milada Butueva | Dr. Leonor Gama-Norton | Natascha Kruse | Daniel Maeda | Prof. Dr. Peter P. Müller | Dr. Kristina Nehlsen | Dr. Upneet Sandhu | Stephanie Sievers

Im Rahmen dieses Projekts entwickeln wir zelluläre Modelle und transgene Maus-Modellsysteme. Dabei nutzen und entwickeln wir neue molekularbiologische Strategien zur vorhersagbaren Expression von Genen. Diese Systeme setzen wir gezielt für verschiedene Fragestellungen im Rahmen der Infektionsforschung ein.

Gerichtete Integration von Expressionskassetten In der Vergangenheit haben wir sehr effiziente Verfahren entwickelt, um Transgene vorhersagbar in Zellen zu exprimieren. Dazu nutzen wir Verfahren zur gerichteten Integration von Expressionskassetten in zuvor charakterisierte chromosomale Orte, die die Transgenexpression optimal unterstützen. So können wir die Expressionseigenschaften verschiedener Kassetten an definierten Integrationsorten untersuchen und optimieren. Dies wurde am Beispiel der Antikörperproduktion sowie der Produktion therapeutischer Retroviren verfolgt und zur Etablierung von entsprechenden Produzentenzellen umgesetzt. Eine optimale Expression kann erzielt werden, wenn eine an den Integrationsort angepasste Expressionskassette integriert wird. In verschiedenen Zellsystemen wurden so Expressionskassetten auf die jeweiligen Integrationsorte zugeschnitten, wodurch eine hohe Expressionsrate erzielt werden konnte.

Strikt regulierte und gewebespezifische Genexpression in der Maus: Mausmodell für induzierte Hepatitis Basierend auf den Strategien zur vorhersagbaren Transgenexpression haben wir eine Plattform auf murinen embryonalen Stammzellen aufgebaut, die die schnelle Generierung von transgenen Mäusen mit gewebespezifischer und strikt kontrollierter Genexpression erlaubt. Hierfür verwenden



Mausmodelle mit induzierter leberspezifischer Aktivierung von Antigenen.

A. Nachweis der aktivierten Luciferase über Biolumineszenz.

B. Die Aktivierung von Ovalbumin führt zur Schädigung von Hepatozyten und Freisetzung von spezifischen Enzymen (ALT)

wir sowohl transkriptionell als auch posttranskriptionell regulierte Module. Wir setzen diese nun ein, um Antigene von Viren (HBV, HCV) leberspezifisch zu exprimieren. Die Induktion der viralen Antigene in der Leber führt zu einer spezifischen Erkennung der Antigen-präsentierenden Hepatozyten durch CD8 T-Zellen und wird von einer massiven Hepatitis begleitet. Mit diesem Mausmodell untersuchen und charakterisieren wir nun die Interaktion von T-Zellen mit leberspezifisch-exprimierten viralen Antigenen.

Ein Toxin/Antitoxin-Expressionssystem Um die Genexpression in Säugerzellsystemen zu stabilisieren, werden normalerweise Selektionssysteme eingesetzt, die die Kultivierung der Zellen in Anwesenheit bestimmter Selektionsagenzien erlauben. Für viele *in vivo* Anwendungen ist eine derartige Selektion jedoch nicht möglich. Wir haben daher ein System entwickelt, das es erlaubt, die Expression selektionsfrei durch ein Toxin/Antitoxin-System zu stabilisieren. Hierfür wurde die Expression des gewünschten Proteins mit der Expression eines Antitoxins gekoppelt und so ein in der Zelle exprimiertes Toxin neutralisiert. Mit diesem System kann eine Stabilisierung der Proteinexpression über mehrere Monate erreicht werden.

Verhinderung von mikrobiellen Biofilmen auf Implantatoberflächen Zur Verhinderung von Biofilmen auf medizinischen Implantaten wurden Beschichtungen zur kontrollierten Freisetzung von Antibiotika entwickelt. Zwei unterschiedliche Strategien wurden angewandt. Eine modifizierte nanoporöse Oberflächenbeschichtung wurde mit einem Antibiotikum beladen, welches über eine längere Zeitdauer langsam freigesetzt wurde. Alternativ wurde eine Beschichtung auf Basis eines Sekundärmetaboliten entwickelt, welche *in vitro* für ca. eine Woche antibakterielle Aktivität gegen *P. aeruginosa* zeigte.

Sandhu, U., Cebula, M., Behme, S., Riemer, P., Wodarczyk, C., Reimann, J., Schirmbeck, R., Hauser, H. and Wirth, D. (2011) Strict control of transgene expression in a mouse model for sensitive biological applications. *Nucleic Acids Research* (in press)

Gama-Norton, L., Herrmann, S., Schucht, R., Coroadinha, A., Löw, R., Bartholomae C, Schmidt M, Alves, P., Baum, C., Schambach, A., Hauser, H., and Wirth, D. (2010) Retroviral vector performance upon integration into defined chromosomal loci of modular packaging cell lines. *Human Gene Therapy* 21(8):979-91.

Nehlsen, K., Herrmann, S., Zauers, J., Hauser, H. and Wirth, D. (2010) Toxin-antitoxin based transgene expression in mammalian cells. *Nucleic Acids Research* 38(5), e32.

May, T., Butueva, M., Bantner, S., Markusic, D., Seppen, J., Weich, H., Hauser, H., and Wirth, D. (2010). Synthetic gene regulation circuits for control of cell expansion. *Tissue Engineering Part A*. 6(2): 441-452

Nehlsen, K., Schucht, R., Gama-Norton, L., Kromer, W., Baer, A., Cayli, A., Hauser, H. and Wirth, D. (2009) Recombinant protein expression by targeting pre-selected chromosomal loci. *BMC Biotechnology*, 9, 100.



04 Strategien für Prävention und Therapie

THEMENSPRECHER | Prof. Dr. Dr. Carlos A. Guzmán | Abteilung für Vakzinologie und Angewandte Mikrobiologie | cag@helmholtz-hzi.de

Ein Drittel der jährlichen Todesfälle auf der Welt sind direkt auf Infektionskrankheiten zurückzuführen. Darüber hinaus sind Mikroorganismen für wenigstens 15% aller Krebserkrankungen verantwortlich und spielen auch bei der Pathogenese vieler chronischer Erkrankungen eine wesentliche Rolle. So deutet z.B. eine kürzlich durchgeführte Studie darauf hin, dass eine chronische Tuberkulose das Risiko, an Lungenkrebs zu erkranken, signifikant erhöht. Die von den Krankheitserregern ausgehende Bedrohung wird zudem noch dadurch verstärkt, dass immer mehr Erreger Resistenzen gegen nahezu alle existierenden Therapeutika entwickeln. Aus diesen Gründen ist die Entwicklung neuer Ansätze zur Bekämpfung von Krankheitserregern unbedingt erforderlich. Das Hauptziel dieses Topics ist es daher, innovative Techniken und Strategien zur Vorbeugung, Behandlung und Kontrolle von Infektionen und Infektionsassoziierten Krankheiten zu entwickeln. Um dieses Ziel zu erreichen, werden neue Zielstrukturen und bioaktive Moleküle für Behandlungen identifiziert, neue Immuninterventionen entwickelt und neue Diagnoseverfahren und Biomarker eingeführt.

In dem Projekt „Molekulare Mechanismen der Hepatitis-C-Virus-Infektion und Replikation“ werden die für die Replikation des Hepatitis C Virus (HCV) entscheidenden Interaktionen zwischen Virus und Wirt untersucht. Die hier gewonnenen Erkenntnisse sollen dazu beitragen, neue Zielstrukturen für Medikamente zur Hemmung der HCV-Replikation zu definieren. Darüber hinaus sollen sie helfen, Screening-Methoden zur Identifikation von Molekülen zu etablieren, die in der Lage sind, für die Replikation wichtige Prozesse zu unterbrechen. So sollen mittels zellbasierter Untersuchungen die zellulären Kofaktoren identifiziert werden, die HCV für seine Vermehrung benötigt. Außerdem sollen zellbasierte Hochdurchsatzverfahren zur Identifikation HCV-spezifischer Inhibitoren aus der HZI Naturstoffbank entwickelt werden. In diesem Zusammenhang wurde in Kooperation mit der Abteilung Chemische Biologie ein Screening-System entwickelt, welches basierend auf dem Enzym Luziferase das Monitoring der HCV-Replikation im 384-Well-Format ermöglicht. Zeitgleich soll zudem der direkte Einfluss immunsuppressiver Medikamente auf die HCV-Vermehrung bestimmt werden. Dies ist von besonderem Interesse, da chronische HCV-Infektionen eine Hauptursache für Lebertransplantationen darstellen und die Immunsuppression zur Verhinderung einer Abstoßung des Transplantats zwingend erforderlich ist. Die geplanten Studien könnten also dazu beitragen, die Behandlung transplantierte HCV-Patienten zu verbessern. Ein besonderer Fokus der Arbeit liegt auf der Charakterisierung von solchen Faktoren, die für die strikte Wirtsspezifität verantwortlich sind. Die Aufklärung dieser Faktoren soll bei der Entwicklung von Kleintiermodellen für dieses Virus helfen.

In dem Projekt „Chronische Infektion und Krebs“ werden innovative Mausmodelle entwickelt, um die Rolle der Zellalterungsprozesse bei der Immunabwehr während chronischer Leberentzündung und Leberkrebs zu erforschen. Dies ist verbunden mit Untersuchungen zum onkogenen Potenzial von HBV- und HCV-Strukturproteinen bei der Entstehung von Leberkrebs. Es sollen insbesondere auf funktionaler Genomanalyse basierende Studien durchgeführt werden, um die der Leberschädigung, der Leberregeneration, sowie dem Leberkrebs zugrunde liegenden molekularen Mechanismen aufzuklären. Zu diesem Zweck wird die auf microRNA basierende shRNA-Technologie eingesetzt, mit der eine stabile oder auch reversible RNAi-vermittelte Hemmung endogener Gene in kultivierten Zellen oder in experimentellen Mausmodellen erzielt werden kann. Zur Identifikation neuer therapeutisch wirksamer Substanzen werden retro- und lentivirale shRNA „Genome-scale“-Banken des murinen und humanen Genoms eingesetzt. Darüber hinaus wird die Rolle der Zellalterungsprozesse bei der Immunabwehr während chronischer Leberentzündung und Leberkrebs untersucht. Hierbei liegt der Fokus auf der Wechselwirkung zwischen alternden Zellen und dem Immunsystem.

Das Projekt „Die Alterung des Immunsystems“ hat zum Ziel, die Auswirkungen anhaltender Infektionen auf die Immunregulation sowie die „Vergreisung“ des Immunsystems aufzuklären. Es besteht Konsens darüber, dass die adaptive Immunantwort in alten Menschen beeinträchtigt ist, da mit zunehmendem Alter die Anzahl naiver T-Zellen sowie die klonale Vielfalt abnehmen, während die

Anfälligkeit gegenüber Infektionen zunimmt. Die Mechanismen, die diese Prozesse steuern, sind jedoch nicht vollständig aufgeklärt. Das Cytomegalovirus (CMV) ist allgegenwärtig, d.h. die Mehrheit der Menschen auf der Welt ist infiziert. CMV etabliert eine lebenslange latente Infektion, welche das Repertoire der T-Gedächtniszellen beherrscht. Aus diesem Grund werden die zellulären und molekularen Mechanismen aufgeklärt, die für die Induktion der adaptiven Immunantwort während einer CMV-Infektion verantwortlich sind. Außerdem werden sowohl die Auswirkungen auf die Entwicklung des T-Zell-Repertoires als auch auf die Immunantworten gegen CMV und andere chronische Infektionen untersucht. Es wird erwartet, dass die in diesem Projekt gewonnenen Erkenntnisse dazu beitragen, die Entwicklung neuer Behandlungsstrategien zu fördern – insbesondere für ältere Menschen.

Das Projekt „Interaktion zwischen angeborener und adaptiver Immunität“ untersucht die Rolle des Typ-I Interferons (IFN-I) bei der Kontrolle der Virusausbreitung sowohl in der Peripherie als auch im zentralen Nervensystem. Dies ist von großer Bedeutung, da IFN-I bereits wenige Stunden nach der Infektion gebildet wird und so das Überleben des Wirtes garantiert, bis nach einigen Tagen die Virus-spezifische adaptive Immunantwort das Pathogen effizient bekämpft. Es wird untersucht, wie DNA- (humanes CMV und Vaccinia Virus) oder RNA-Viren (HCV und vesikuläres Stomatitis Virus) IFN-I-Antworten stimulieren und welche Mechanismen sie entwickelt haben, um die antiviralen Eigenschaften von IFN zu hemmen. In diesem Zusammenhang werden die antiviralen Immunantworten humaner konventioneller und plasmazytoider dendritischer Zellen (DZ) *in vitro* und die Rolle muriner DZ in *in vivo* Studien untersucht. Hierbei sind Gen-Stimulations-Signaturen Virus-stimulierter humaner DZ von besonderem Interesse, da sie möglicherweise zur Identifikation neuer Biomarker beitragen. Interessanterweise haben alle untersuchten Viren Strategien entwickelt, um entweder die Induktion der IFN-I-Antwort oder aber die Funktion von IFN-I zu hemmen. Daher werden die unterschiedlichen Induktionsmechanismen in den verschiedenen anatomischen Nischen genauso analysiert werden, wie der Einfluss des Virus-induzierten IFN auf die Stimulation Virus-spezifischer CD8⁺ T-Zellantworten, Virus-neutralisierende Antikörperantworten sowie NK-Zellantworten. Die in diesem Projekt erzielten Ergebnisse werden genutzt, um die auf pegyliertem IFN- α /Ribavirin basierende Therapie von chronischen HCV Infektionen zu verbessern und um neue Ansätze für Immuntherapien basierend auf antiviralen Zytokinen zu etablieren.

Das Projekt „Antigentransportsysteme und Impfstoffe“ ist auf die Entwicklung neuer Werkzeuge und Strategien zur Optimierung der Anlieferung von Antigenen fokussiert. Im Besonderen werden die mukosalen Applikationsrouten und ihre Nutzung für die Impfstoffentwicklung gegen spezifische Krankheiten analysiert. Das Projekt ist dabei mit einem Programm zur Etablierung der kostengünstigen und effizienten präklinischen Validierung auf Basis des humanisierten Mausmodells (HIS) verbunden, um damit ein Auswahl- und Priorisierungsverfahren zur Bestimmung von Interventionskandidaten zu erhalten. Im Kontext der Impfung spielt die Optimierung des Antigen-Designs eine kritische Rolle. Dies gilt natürlich besonders, wenn ein Pathogen Mechanismen entwickelt hat, die es ihm erlauben, der spezifischen Immunantwort zu entgehen („immune escape mechanism“). Im Fall von *Trypanosoma cruzi* wird zwar eine starke Immunreaktion als Antwort auf eine Impfung bzw. natürliche Infektion ausgelöst, jedoch ist diese nicht ausreichend, um den Parasiten vollständig abzutöten. Erste Studien mit rekombinanten Proteinen unterschiedlicher Domänen von Cruzipain (wichtige Cystein Proteinase von *T. cruzi*) zeigen, dass die Immunisierung mit dem gesamten Cruzipainmolekül in einer schwachen Erkennung der N-terminalen katalytischen Domäne resultiert. Demgegenüber wurde gezeigt, dass die Verschleierung der protektiven Determinanten verhindert werden konnte, wenn das Immunogen, die N-terminale Domäne, angepasst wurde. Dieser Ansatz erlaubt eine Neuausrichtung der Wirtsimmunantwort, welche nun einen erhöhten Schutz bei akuter und chronischer Infektion gewährt. Daneben gibt es in diesem Projekt Aktivitäten, die zu einer Optimierung der Antigen-Anlieferung über die mukosalen Routen führen sollen. Die Stimulation von spezifischen T-Helfer (Th) Antworten ist kritisch für den effizienten Aufbau einer spezifischen Immunität, ohne dabei Nebenwirkungen auszulösen. Bisher ist das Wissen darüber unvollständig, welche Effektormechanismen eine mukosale Impfung auslöst. Die Analyse der nach intranasaler Impfung stimulierten Th-Untergruppen zeigte, dass präferenziell Th17-Zellen induziert wurden.

Das Projekt „Therapeutische zelluläre Vakzine“ beschäftigt sich mit den Strategien persistenter Krankheitserreger, die das Immunsystem täuschen und Immunreaktionen umgehen. Dies kann durch die Stimulation professioneller Antigen-präsentierender Zellen (APZ), wie z.B. DZ, erreicht werden. Allerdings kann eine starke Aktivierung des Immunsystems zu pathogenen Prozessen führen, in deren Verlauf die Reaktion durch immunsuppressive Zellen, wie z.B. mesenchymale Stromazellen, kontrolliert wird. Durch Modifizierung der APZ mittels adenoviraler Vektoren, welche für Antigene und immunomodulatorische Moleküle kodieren, wurde die Kapazität der Antigenpräsentation verstärkt. Darüber hinaus wurde beobachtet, inwieweit die stimulatorische Kapazität der DZ durch Infektion mit *Mycobacterium bovis* BCG erhöht wird. Um die Translation der Ergebnisse der Grundlagenforschung in Richtung Zelltherapie zu ermöglichen, mussten flexible und stabile GMP- (Good Manufacturing Praxis) konforme Prozesse für die Kultivierung und Modifikation der unterschiedlichen Zelltypen (z.B. DZ) durch den Einsatz geschlossener Beutel-Systeme („closed integrated bag system“) etabliert werden. Durch dielektrische Barriereentladung in Gegenwart oberflächenaktivierender Moleküle werden die Eigenschaften der Beutel-Systemoberflächen so verändert, dass eine Kultivierung von adhärennten Zellen, wie z.B. mesenchymalen Stammzellen, ermöglicht wurde.

Das Projekt „Molekulare Diagnostik mikrobieller Krankheitserreger“ ist auf die Entwicklung und Applikation von hochauflösenden molekularen diagnostischen Werkzeugen zum Studium von Lebensmittel- und Trinkwasser-vermittelten Infektionen durch bakterielle Pathogene fokussiert. Mit diesen Werkzeugen sollte es möglich sein, einzelne Stämme, die für Infektionen von individuellen Patienten oder Infektionsausbrüche verantwortlich sind, zu identifizieren. Darüber hinaus ermöglichen diese Werkzeuge, Anwesenheit, Virulenz und das Maß der metabolischen Aktivität der Pathogene in humanen, veterinären und bakteriellen Proben nachzuweisen. Durch die Implementierung neuer Methoden, wie z.B. „Multi-Loci Variable Number of Tandem Repeats Analysis“ (MLVA), soll das Verständnis für die Infektionsrouten der bakteriellen Pathogene aus Lebensmitteln bzw. Wasser weiter vertieft werden. Weiterhin sollen die Analysen Aufschluss über die Evolution und Epidemiologie der pathogenen Bakterien in der natürlichen und klinischen Umgebung gewähren. Die Validierung einer MLVA-Methode, die für die Analyse von *Vibrio parahaemolyticus* mit Hilfe von chilenischen Isolaten entwickelt wurde, zeigte, dass – neben dem Auftauchen einer Pandemie – eine lokale Evolution einen starken Einfluss auf die Infektiösität besitzt. Die Adaption der anerkannten MLVA-Methode mit *Legionella pneumophila* auf die Analyse von Trinkwasser wird es erlauben, spezifische MLVA-Genotypen zu identifizieren, ohne diese erst kultivieren zu müssen.

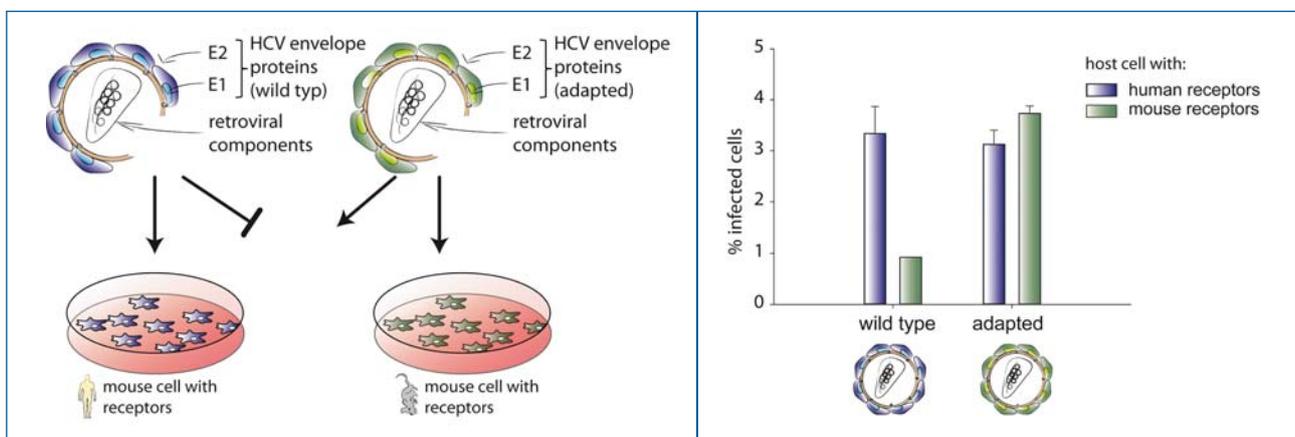


Abb. 2. Infektion von Mauszellen mit retroviralen HCV-Pseudopartikeln. Diese Pseudopartikel tragen entweder die Wildtyp-Hüllproteine (oben links) oder die an Maus-CD81 adaptierten Hüllproteine (oben rechts). Mit diesen Pseudopartikeln wurden Mauszellen infiziert, die entweder alle vier humanen oder die entsprechenden Maus-Faktoren tragen (Mitte). Die Pseudopartikel übertragen ein eGFP Reportergen, so dass sich infizierte Zellen anhand ihrer eGFP-Fluoreszenz identifizieren lassen. Die Anzahl der infizierten Zellen ist angegeben (unten). (siehe Beitrag nächste Seite)

04.1 Molekulare Mechanismen der Hepatitis-C-Virus-Infektion und -Replikation

PROJEKTLEITER | Prof. Dr. Thomas Pietschmann | Abteilung für Experimentelle Virologie | Twincore | tpi07@helmholtz-hzi.de

PROJEKTMITARBEITER | Dorothea Bankwitz | Dr. Julia Bitzegeio | Dr. Christiane Brohm | Dr. Sandra Ciesek | Martina Friesland | Dr. Sibylle Haid | Kathrin Hüging | Dr. Eike Steinmann

Das Hepatitis-C-Virus (HCV) infiziert neben dem Menschen nur Schimpansen. Das derzeit einzige Tiermodell sind „humanisierte“ Mäuse ohne Immunsystem, denen primäre humane Leberzellen transplantiert werden, in denen sich HCV vermehren kann. Dieses System ist jedoch für die Impfstoffentwicklung ungeeignet, da mit diesen Tieren wegen des Immundefektes keine immunologischen Studien durchgeführt werden können. Wir untersuchen, warum HCV sich in murinen Leberzellen nicht vermehrt. Auf diesem Weg wollen wir verstehen, wie HCV entscheidende Kofaktoren nutzt und gleichzeitig lernen, welche Barrieren überwunden werden müssen, um ein immunkompetentes Kleintiermodell für HCV zu entwickeln.

Der HCV-Zelleintritt in Mauszellen funktioniert nicht ohne humane Zelleintrittsfaktoren, da die Proteine auf der Oberfläche des Virus nur schlecht zu den entscheidenden Mausproteinen auf den Mausleberzellen passen. Damit HCV in Leberzellen eindringen kann, muss das Virus mit vier verschiedenen Molekülen auf der Oberfläche der Zielzelle interagieren. Diese zellulären Proteine sind SR-BI, CD81, Claudin-1 und Occludin. Besonders CD81 und OCLN sind für die Spezies-Spezifität verantwortlich. Unsere neuen Ergebnisse zeigen, dass Claudin-1 aus der Maus nur bedingt von HCV für den Zelleintritt genutzt wird, so dass auch Claudin-1 zur HCV Spezies-Spezifität beiträgt.

Adaptation von HCV an murine Zelleintrittsfaktoren

In diesem Kontext haben wir versucht, das Virus an die Maus anzupassen. Hierfür wurde zunächst eine Leberzelllinie hergestellt, die zwar über humanes SR-BI, Claudin-1 und Occludin verfügt, der aber das menschliche CD81 fehlt. Anschließend haben wir künstlich die Mausvariante des CD81 eingeschleust. Daraufhin ließen sich die Zellen wieder infizieren – allerdings war die Effizienz verglichen mit dem humanen CD81 etwa 100-fach niedriger (Abb. 1). Durch serielle Passage des Virus in diesen Zellen hat sich das Virus so gewandelt, dass es die Mausvariante des CD81 genauso effizient nutzen konnte, wie die humane Variante (Abb.2, siehe S. 101). Allerdings hat diese Veränderung für das Virus seinen Preis: Das adaptierte Virus ist wesentlich anfälliger gegenüber Antikörpern aus Patienten geworden. Vermutlich hat die Anpassung an das Maus-CD81 besonders empfindliche Bereiche auf der Virusoberfläche freigelegt, so dass das Virus nun durch Antikörper besser ausgeschaltet werden kann. Möglicherweise ist diese „geöffnete“ Struktur, welche Konformationswechsel erleichtert, entscheidend für die Nutzung nicht-humaner Eintrittsfaktoren.

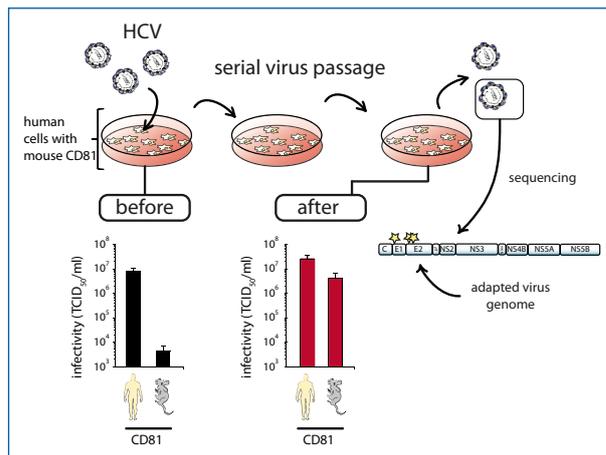


Abb. 1. Adaptation des HCV an CD81 aus der Maus. HCV wurde in humane Leberzellen transfiziert, die murines CD81 anstelle des humanen CD81 tragen. Der Zellkulturüberstand dieser Zellen wurde seriell auf den humanen Zellen mit Maus-CD81 passiert. Der Erfolg der Adaptation wurde durch Infektion von Zellen, die entweder humanes oder murines CD81 tragen, überprüft (unten). Nach der Adaptation wurde das virale Genom isoliert und sequenziert. Drei Mutationen im Bereich der Hüllproteine wurden identifiziert, welche für die Adaptation an Maus-CD81 verantwortlich sind; sie sind mit einem Stern im Virusgenom markiert (unten rechts).

Perspektive Prinzipiell sollte es also möglich sein, das Virus an weitere nicht-humane zelluläre Replikationsfaktoren anzupassen. Auf diese Weise können wir lernen, wie sich HCV die entsprechenden Wirtsfaktoren zunutze macht und warum dies etwa in Mauszellen nicht gelingt. So werden die Hürden für die Entwicklung eines immunkompetenten Kleintiermodells erkennbar und es können langfristig Wege gefunden werden, diese zu überwinden.

Bitzegeio J, Bankwitz D, Hueging K, Haid S, Brohm C, Zeisel MB, Herrmann E, Iken M, Ott M, Baumert TF & Pietschmann T. (2010) Adaptation of hepatitis C virus to mouse CD81 permits infection of mouse cells in the absence of human entry factors. *PLoS Pathogens* 6:e1000978.

Haid S, Windisch MP, Bartenschlager R & Pietschmann T. (2010) Mouse-specific residues of claudin-1 limit hepatitis C virus genotype 2a infection in a human hepatocyte cell line. *Journal of Virology* 4(2):964-75.

Bankwitz D, Steinmann E, Bitzegeio J, Ciesek S, Friesland M, Herrmann E, Zeisel MB, Baumert TF, Keck ZY, Fong SK, Pécheur EI, Pietschmann T. (2010) Hepatitis C virus hypervariable region 1 modulates receptor interactions, conceals the CD81 binding site, and protects conserved neutralizing epitopes. *Journal of Virology* 84(11):5751-63.

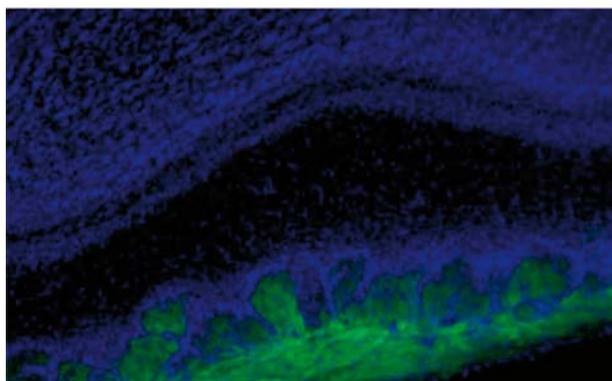
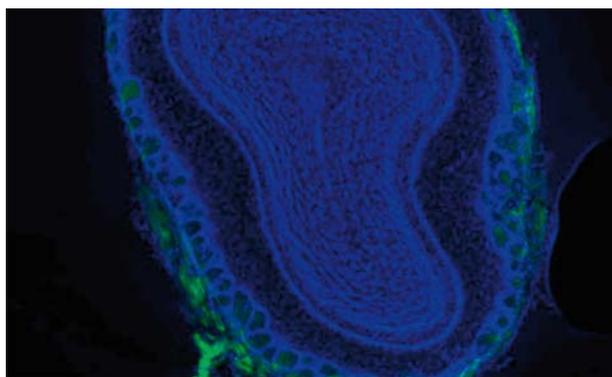


04.2 Interaktion zwischen angeborener und adaptiver Immunität

PROJEKTLEITER | Prof. Dr. Ulrich Kalinke | Institut für Experimentelle Infektionsforschung | Twincore | ulrich.kalinke@twincore.de

PROJEKTMITARBEITER | Dr. Claudia Detje | Dr. Theresa Frenz | Elena Grabski | Sabrina Heindorf | Julia Heinrich | Christian Mers | Claudia Soldner

Nach einer Virusinfektion werden in der Regel innerhalb von Stunden Typ I Interferon-Antworten induziert, die für die ersten Tage das Überleben des Wirts sichern. Erst nach ungefähr einer Woche wird das adaptive Immunsystem so weit aktiviert, dass es in der Lage ist, Pathogene zu eliminieren. In früheren Arbeiten haben wir gefunden, dass nach einer viralen Infektion eine kleine Anzahl hoch spezialisierter Immunzellen, die auch als plasmazytoide dendritische Zellen (pDC) bezeichnet werden, große Mengen an schützendem Typ I Interferon produzieren. Praktisch alle genauer untersuchten Viren haben Gegenmaßnahmen zur Hemmung der Induktion oder der Funktion von Interferon entwickelt. Wir erforschen, wie unterschiedliche Viren Typ I Interferon-Antworten induzieren, welche Strategien sie entwickelt haben,



Nach intranasaler Infektion von Mäusen befällt VSV Riechnerven, wandert über die Axone bis in den Riechkolben und wird dort in peripheren Bereichen Typ I Interferon-abhängig gestoppt. Bisher ist unklar, ob im Riechkolben gebildetes Interferon eine kritische Rolle spielt, welcher Zelltyp lokal zur Interferonproduktion angeregt wird und welche molekularen Mechanismen dabei eine Rolle spielen. In der Abbildung ist die histologische Analyse des Riechkolbens einer Maus dargestellt, die mit einem eGFP exprimierenden VSV infiziert worden ist (oben). Es ist deutlich erkennbar, dass das Virus in der glomerulären Schicht des Riechkolbens gestoppt wird (unten). Fotos: Twincore

diese zu unterwandern, und auf welche Weise Interferone das Überleben des Wirts sichern.

Mechanismen der Typ I Interferon Induktion und seine protektive Funktion Die molekularen Mechanismen der Induktion von Typ I Interferon können in verschiedenen Geweben sehr unterschiedlich sein. Wir untersuchen in Mausmodellen, wie der Eintritt des Vesikulären Stomatitis Virus (VSV) über das Riechzentrum in das zentrale Nervensystem Interferon-abhängig inhibiert wird. Weiterhin analysieren wir, welchen Einfluss Typ I Interferon Antworten auf die Funktion von Immunzellen haben. In diesem Zusammenhang haben wir gefunden, dass vom Vakziniavirus abgeleitete attenuierte Erregervarianten, die starke Typ I Interferon-Antworten induzieren, auch eine Typ I Interferon-abhängige Expansion von Virus-spezifischen T-Zellen zeigen. Dabei spielt die Typ I Interferon-Stimulation sowohl der Antigen-präsentierenden dendritischen Zellen als auch der T-Zellen eine zentrale Rolle. Weiterhin untersuchen wir den Einfluss von Typ I Interferon auf die Induktion lang anhaltender Antikörperantworten. Diese Arbeiten spielen für die Entwicklung neuer Impfstoffe eine wichtige Rolle.

Virus-vermittelte Aktivierung humaner pDC Ein Teil der Patienten mit einer chronischen Hepatitis-C-Virus (HCV) Infektion kann erfolgreich mit einer Interferon-alpha/Ribavirin Kombinationstherapie behandelt werden. Bisher ist aber nur wenig darüber bekannt, ob bei einer HCV-Infektion das körpereigene Interferon-System ausreichend aktiviert wird. Wir untersuchen, welche HCV und/oder wirtskodierten Faktoren die Stärke und Zusammensetzung von HCV-induzierten Zytokinantworten humaner pDC beeinflussen. Diese Arbeiten werden *in vitro* mit primären pDC durchgeführt, die aus Blutproben von gesunden Spendern isoliert wurden. In der Zukunft sollen auch Experimente mit pDC von chronisch HCV-infizierten Patienten durchgeführt werden.

Perspektive Ein verbessertes Verständnis der vielfältigen Funktionen von Typ I Interferon kann helfen, Typ I Interferon-basierte Therapien von Tumorerkrankungen, Autoimmunerkrankungen und Virusinfektionen zu optimieren. Weiterhin liefern vertiefte Erkenntnisse über virale Mechanismen der Immun-Stimulation und -Unterwanderung neue Ansätze für die Impfstoffentwicklung.

Frenz, T., Waibler, Z., Hofmann, J., Hamdorf, M., Lantermann, M., Reizis, B., Tovey, M.G., Aichele, P., Sutter, G., & Kalinke, U. (2010) *European Journal of Immunology* **40**, 2769-2777.

Waibler, Z., Anzaghe, M., Frenz, T., Schwantes, A., Pöhlmann, C., Ludwig, H., Palomero-Otero, M., Alcami, A., Sutter, G., & Kalinke, U. (2009) *Journal of Virology* **83**, 1563-1571.

Detje, C.N., Meyer, T., Schmidt, H., Kreuz, D., Rose, J.K., Bechmann, I., Prinz, M., & Kalinke, U. (2009) *Journal of Immunology* **182**, 2297-2304.

04.3 Antigentransportsysteme und Impfstoffe

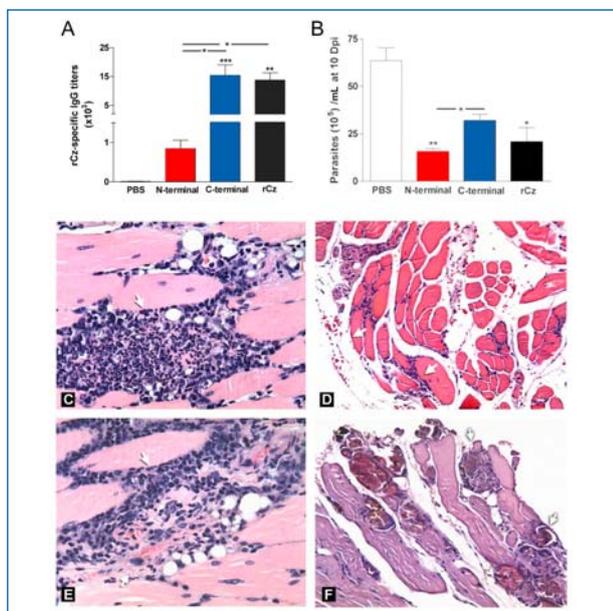
PROJEKTLEITER | Prof. Dr. Dr. Carlos A. Guzmán | Abteilung für Vakzinologie und Angewandte Mikrobiologie | cag@helmholtz-hzi.de

PROJEKTMITARBEITER | Dr. Pablo D. Becker | Dr. Jennifer Debarry | Dr. Thomas Ebensen | Dr. Miriam Nörder | Dr. Peggy Riese | Rimma Libanova | Kirsten Scholz | Dr. Kai Schulze | Sebastian Weissmann | Dr. Beata Zygmont

Das Hauptziel dieses Projektes ist die Entwicklung von Werkzeugen und Strategien zur Verbesserung des Transports von Impfstoffantigenen, insbesondere über die Schleimhäute. Sie sollen anschließend bei der Herstellung von Impfstoffkandidaten gegen bestimmte Erkrankungen genutzt werden.

Verbesserung des Antigen-Designs Sowohl eine Infektion mit *Trypanosoma cruzi* als auch eine Impfung gegen diesen Parasiten lösen eine starke Immunantwort aus. Dass *T. cruzi* dennoch im Wirt überleben kann, deutet auf unzureichende bzw. mangelhafte Immunantworten hin. Eine der Hauptcysteinproteinasen von *T. cruzi*, das sogenannte Cruzipain, weist gute Antigenmerkmale auf. Daher produzierten wir sowohl rekombinantes Cruzipain als auch dessen N- und C-terminale Domänen. Mäuse wurden mit den rekombinanten Proteinen in Kombination mit CpG-ODN immunisiert und die Antigen-spezifischen Antikörperantworten analysiert. Die höchsten IgG-Titer wurden in Mäusen nachgewiesen, die mit der C-terminalen Domäne oder dem vollständigen Protein immunisiert wurden. Im Gegensatz dazu wurden nur schwache Antikörperantworten durch die N-terminale Domäne stimuliert.

Dies legt einen *immune escape*-Mechanismus nahe, bei dem es zu einer reduzierten Antikörperproduktion gegen die katalytische N-terminale Domäne kommt. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die zellulären Antworten in Mäusen, die mit dem vollständigen Cruzipain immunisiert wurden, nur schwach durch die N-terminale Domäne restimuliert werden, während der Großteil der Antworten durch die C-terminale Domäne hervorgerufen wird. Allerdings war die zelluläre Antwort deutlich stärker, wenn die N-terminale Domäne für die Immunisierung genutzt wurde. Dies lässt vermuten, dass die zellulären Antworten durch Cruzipain herunter reguliert werden, um so eine Erkennung der N-terminalen Domäne zu vermeiden. Diese Maskierung der essenziellen Domäne kann jedoch umgangen werden, wenn die N-terminale Domäne als maßgeschneidertes Immunogen genutzt wird. Hierbei wird die Immunantwort des Wirtes umgelenkt und dadurch ein erhöhter Schutz erlangt. So konnten Mäuse, die mit der N-terminalen Domäne immunisiert wurden, eine Infektion besser kontrollieren. Erkennbar wurde dies durch eine signifikant geringere Parasitenbelastung während der akuten Phase, sowie wesentlich reduzierte Gewebeerkrankungen während der chronischen Phase.



(A) Antikörperantwort in Mäusen, die mit rekombinantem Cruzipain (rCz) oder dessen Domänen immunisiert wurden. (B) Parasitenbelastung während der akuten Phase der Infektion mit *T. cruzi* in immunisierten Mäusen. (C) Bilder der Skelettmuskulatur von Mäusen, die nur mit PBS immunisiert wurden, wiesen schwere Entzündungen auf (x40), während Mäuse, die jeweils mit rCz (D), der C-terminalen Domäne (E) und der N-terminalen Domäne (F) immunisiert wurden, moderate Entzündungen mit Ödemen (Pfeile; x10), moderate Entzündungen mit Kollagenablagerung (Pfeile; x40) sowie leichte Entzündungen (x20) aufwiesen. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Optimierung der Impfstrategien Die mukosale Impfung stellt eine attraktive Strategie der Antigenadministration dar, da sie nicht mit Schmerzen oder Stress verbunden ist, nur eine einfache und kosteneffiziente Administrationslogistik benötigt und kein hochqualifiziertes Personal erfordert. Auch wenn viele Besonderheiten des mukosalen Immunsystems bereits aufgedeckt wurden, ist das Wissen über die Effektormechanismen, die durch eine mukosale Immunisierung stimuliert werden, nach wie vor lückenhaft. Um eine effiziente Immunität ohne Nebeneffekte zu induzieren, ist in diesem Zusammenhang die Stimulierung spezifischer Th-Zellen kritisch zu betrachten. Aus diesem Grund untersuchten wir, welche Th-Zellen nach einer intranasalen Immunisierung präferenziell stimuliert werden. Im Vergleich zur parenteralen Immunisierung entdeckten wir eine Hochregulierung von CCR-6 auf CD4⁺-Zellen, die mit einer vermehrten Produktion von IL-17 einherging. Interessanterweise konnten wir zeigen, dass diese präferenzielle Induktion einer Th17-Immunantwort unabhängig vom verwendeten Adjuvans ist.

Es ist bekannt, dass Th17-Zellen bei der Immunantwort gegen respiratorische Pathogene eine entscheidende Rolle spielen. Daher hat unsere Entdeckung, dass eine Th17-Antwort spezifisch durch intranasale Immunisierung ausgelöst werden kann, wichtige Bedeutung für das rationale Impfstoffdesign.

Cazorla, S. I., Frank, F. M., Becker, P. D., Arnaiz, M., Mirkin G. A., Corral R. S., Guzmán C. A.* and Malchiodi E. L.* (2010). Redirection of the immune response to the functional catalytic domain of the cysteine proteinase cruzipain improves protective immunity against *Trypanosoma cruzi* infection. *Journal of Infectious Diseases*. 202:136-144. *Corresponding authors.

Zygmont, B. M., Rharbaoui F., Groebe L., and Guzman C. A. (2009). Intranasal immunization promotes Th17 immune responses. *Journal of Immunology*. 183:6933-6938.



04.4 Chronische Infektion und Krebs

PROJEKTLEITER | Prof. Dr. Lars Zender | **Nachwuchsgruppe Chronische Infektionen und Krebs** | lze08@helmholtz-hzi.de

PROJEKTMITARBEITER | Dr. Tae-Won Kang | Dr. Michelle Stange | Dr. Torsten Wüstefeld | Dr. Tetyana Yevsa | Daniel Dauch | Florian Heinzmann | Lisa Hönicke | Anja Hohmeyer | Nils Jedicke | Marina Pesic | Ramona Rudalska

Leberkrebs (Hepatozelluläres Karzinom, HCC) ist eine der häufigsten und tödlichsten Krebsarten weltweit. Pro Jahr kommen mehr als 700.000 neuen Fällen hinzu, von denen 50.000 in Europa auftreten.

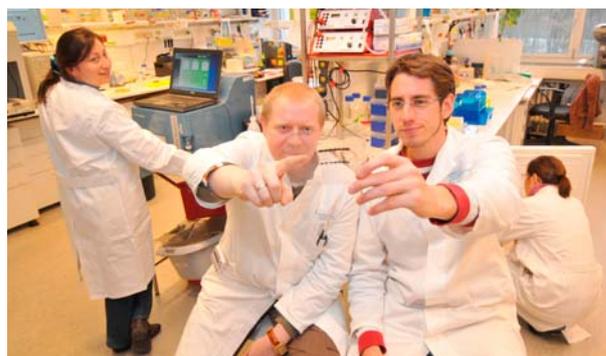
Zur Erforschung der molekularen Mechanismen von Leberschäden, Leberregeneration und Leberkrebs wählen wir funktionelle genomische Ansätze. Dabei machen wir uns den natürlichen Prozess der RNA-Interferenz (RNAi) zunutze. In den letzten Jahren haben wir die Mikro-RNA basierte shRNA-Technologie so weit entwickelt und verfeinert, dass sowohl die stabile als auch die reversible RNAi-vermittelte Inhibition aller endogenen Gene, die in kultivierten Zellen und Leberregenerations- und Leberkrebs-Mausmodellen vorkommen, ermöglicht wird. Die Nutzung von induzierbarer RNAi ermöglicht uns die Einwirkung von Genprodukten auf regenerierende Lebern und wachsende Tumoren von Mäusen sowohl auf dem Einzelgen-Level als auch durch aggregiertes Multigen-Screening. Retro- und lentivirale shRNA-Bibliotheken auf Genomebene, die das Genom von Säugern und Menschen beschreiben, werden für Screens genutzt, um neue Therapeutika in der regenerativen Medizin und hepatobiliären Onkologie zu identifizieren.

1. Translationale regenerative Medizin und Zielstrukturen beim Leberzellkarzinom Die Leber hat eine enorme Regenerationsfähigkeit nach durch Toxine und Infektionen verursachten Gewebeschäden. Es ist einzigartig, dass differenzierte Hepatozyten, die normalerweise in der Go-Phase des Zellzyklus angesiedelt sind, nach dem Leberschaden wieder in den Zellzyklus eintreten können und neue Hepatozyten erzeugen. Bei chronischem Leberschaden allerdings kommt es zu einer Überforderung der regenerativen Kapazität der Hepatozyten, die nur partiell durch einen Stammzellbereich kompensiert werden kann. Die Konsequenz ist eine chronische Leberinsuffizienz, eines der größten Gesundheitsprobleme weltweit.

Wir haben ein einzigartiges System etabliert, mit dem wir *in vivo* RNAi-Screens durchführen, um positive und negative Regulatoren der Hepatozyten-Vermehrung während einer chronischen Lebererkrankung zu identifizieren. In einem kürzlich beendeten *in vivo* RNAi-Screen haben wir eine doppelt spezifische Proteinkinase ermittelt, die für die hepatische regenerative Medizin sehr vielversprechend ist. Die funktionelle Charakterisierung hat gezeigt, dass der Knockdown durch verschiedene shRNAs in einem Mausmodell für chronische Leberinfektion zu einer mehr als tausendfach erhöhten Hepatozyten-Proliferationskapazität geführt hat. Folge war eine außerordentlich erhöhte Überlebensrate. Zurzeit arbeiten wir daran, die erhaltenen genetischen Informationen in neue pharmakologische Strategien für die hepatische regenerative Medizin umzusetzen.

2. Translationale Onkologie, „Mosaic Cancer Mouse Modeling“, *in vivo* RNA und Identifizierung neuer innovativer Therapeutika bei Leberkrebs Tumorgenetik kann die Anwendung bestimmter therapeutischer Strategien steuern und das Ergebnis der Behandlung voraussagen. Durch die Kombination von *in vivo* RNAi-Technologie mit leistungsstarken „Mosaic Liver Cancer Mouse Model“-Systemen haben wir große Fortschritte bei der Lokalisierung neuer Krebsgene und Tumorsuppressionsnetzwerke in hepatozellulären Karzinomen (HCC) gemacht. Zusätzlich zu *in vivo*-Einzeluntersuchungen von Tumorsuppressorgenen haben wir *in vivo*-Screens durchgeführt, um diesen Ansatz zu multiplizieren. Kürzlich haben wir den ersten *in vivo* RNAi-Screen durchgeführt, in dem mehr als 10 neue Tumorsuppressorgene in HCC identifiziert wurden.

Laufende Projekte untersuchen die genetische Anfälligkeit für hepatobiliäre Malignome. Dieser Ansatz basiert auf dem Konzept der „Synthetischen Letalität“, das davon ausgeht, dass Tumorzellen durch ihre kumulierten genetischen Modifizierungen Schwachstellen erwerben, die neue therapeutische Interventionen ermöglichen. Mehrere vertrauenerweckende Zielstrukturen wurden identifiziert, und zurzeit versuchen wir, diese in neue Behandlungsstrategien umzusetzen.



Dr. Torsten Wüstefeld (li) und Florian Heinzmann (re) diskutieren Ergebnisse eines Experiments. Links von ihnen: Dr. Tetyana Yevsa, rechts: Ramona Rudalska. Foto: HZI

Zender, L., Xue, W., Zuber, J., Semighini, C.P., Krasnitz, A., Ma, B., Zender, P., Kubicka, S., Luk, J.M., Schirmacher, P., McCombie, W.R., Wigler, M., Hicks, J., Hannon, G.J., Powers, S. & Lowe, S.W. (2008) An oncogenomics-based *in vivo* RNAi screen identifies tumor suppressors in liver cancer. *Cell* **135**(5), 852-64.

Xue, W., Zender, L., Miething, C., Dickins, R.A., Hernandez, E., Krizhanovsky, V., Cordon-Cardo, C. & Lowe, S.W. (2007) Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* **445**(7128), 656-60.

Zender, L., Spector, M.S., Xue, W., Flemming, P., Cordon-Cardo, C., Silke, J., Fan, S.T., Luk, J.M., Wigler, M., Hannon, G.J., Mu, D., Lucito, R., Powers, S. & Lowe, S.W. (2007) Identification and validation of oncogenes in liver cancer using an integrative oncogenomic approach. *Cell* **125**(7), 1253-67.



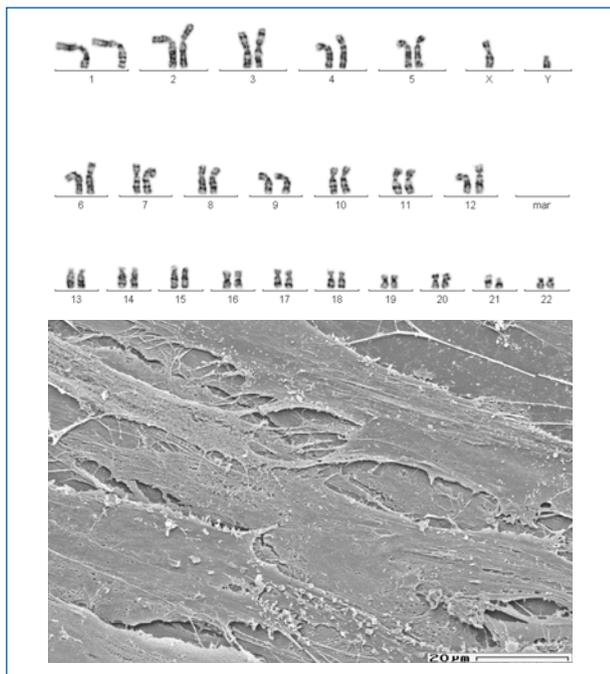
04.5 Therapeutische zelluläre Vakzine

PROJEKTLEITER | Dr. Werner Lindenmaier | Abteilung für Genregulation und Differenzierung | wli@helmholtz-hzi.de

PROJEKTMITARBEITER | Dr. Kurt E. J. Dittmar | Dr. Wilhelm Meyring | Dr. Oliver Schön | Dr. Nadia Zghoul | Claudia Preuß | Ellen Kuppe

Zellbasierte Immuntherapien haben ein großes Potenzial für die Behandlung von Tumoren und persistierenden Infektionen, da durch die Aktivierung der zellulären Immunantwort die infizierten oder veränderten Zellen unschädlich gemacht werden. Die persistierenden Pathogene und Tumorzellen entwickeln Mechanismen, mit denen sie der normalen Immunabwehr entkommen können. Deshalb ist eine Verstärkung der Immunantwort notwendig, z. B. durch Immunisierung mit professionell Antigen-präsentierenden Zellen (dendritischen Zellen (DC)). Dabei besteht jedoch die Gefahr, dass auch eine pathogene Autoimmunreaktion induziert wird – insbesondere bei Verwendung körpereigener Antigene auf Tumorzellen. Hier kann durch immunsupprimierende Zellen wie etwa mesenchymale Stammzellen (MSC) gegengesteuert werden.

Sterile Beutel für die zelluläre Therapie Das größte Hindernis für eine breitere Anwendung zellulärer Therapien besteht darin, dass in der Regel autologe, Patientenspezifische Zellen hergestellt werden müssen und die Herstellung nach den neuen EU-Gesetzen unter cGMP Bedingungen zu erfolgen hat.



Auch nach Passage 22 zeigen die Zellen noch einen normalen diploiden Karyotyp. (oben, Koop, K. Müller, MHH).

Adhärentes Wachstum auf modifizierten Oberflächen und Karyotyp-Stabilität von MSC; Elektronenmikroskopische Aufnahme der auf der Beuteloberfläche adhärent wachsenden mesenchymalen Stammzellen (unten, Koop, und Foto M. Rohde, HZI).

Um dieses Problem für die Herstellung adenoviral modifizierter humaner DC zu lösen, haben wir komplett geschlossene Beutel-Kultursysteme entwickelt. Mit Hilfe von „sterile docking“ können alle Schritte von der Zellgewinnung bis hin zur Formulierung und Kryokonservierung der DC in einem modularem Beutelsystem realisiert werden. Zusätzlich wurde für die DC-Vakzine untersucht, ob ihre Stimulationseigenschaften durch Infektion mit *M. bovis* BCG verbessert werden, und wie in einem transgenen Mausmodell die Balance zwischen Antitumorimmunität und Autoimmunität beeinflusst werden kann.

Das bisherige Beutelsystem war jedoch nur für Suspensionszellen geeignet. Für Zellen wie mesenchymale Stammzellen sind modifizierte, Adhärenz-kompatible Oberflächen erforderlich. Diese Modifikation des Beutelsystems kann durch dielektrische Barriere-Entladung (Plasma) erzielt werden. Plasmabehandlung in Gegenwart geeigneter Vorläufermoleküle wie Silanen oder aminofunktionale Verbindungen erlaubt selektive chemische Modifikation der Beuteloberflächen. Wir konnten so geeignete Oberflächenmodifikationen definieren, die Adhärenz und Wachstum der humanen MSC unterstützen, wogegen die Zellen in Beuteln mit unmodifizierten Oberflächen aggregieren und absterben.

Modifizierte Beutel im Vergleich mit Flaschenkultur

Die in den modifizierten Beuteln kultivierten MSC wurden intensiv mit MSC aus konventioneller Flaschenkultur verglichen. Zelloberflächenmarker, Gentransfereffizienz, adipogene und osteogene Differenzierung, globale Expressionsprofile und genetische Stabilität zeigten keine signifikanten Unterschiede. Mit der Modifikation der inneren Beuteloberfläche durch Plasmabehandlung stehen somit neue Möglichkeiten für die Kultivierung von therapeutischen Zellen in geschlossenen Beutelsystemen zur Verfügung.

Darüber hinaus wurden spezifische, sekundäre Modifikationen der Oberfläche zur Selektion definierter Zellen (CD 14⁺ Monozyten) aus peripherem Blut genutzt – durch Kopplung zellspezifischer Antikörper. Durch mikrostrukturierte Modifikation der Oberflächen können lokale Adhärenz und ortsspezifischer Gentransfer realisiert werden und so durch differentielle Bindung zur Analyse der Interaktion verschiedener Zelltypen beitragen.

Garritsen, H.S., Macke, L., Meyring, W., Hannig, H., Págelow, U., Wörmann, B., Geffers, R., Dittmar, K.E., and Lindenmaier, W. (2010). Efficient generation of clinical-grade genetically modified dendritic cells for presentation of multiple tumor-associated proteins. *Transfusion*. 50, 831-842.

Macke, L., Garritsen, H.S., Meyring, W., Hannig, H., Págelow, U., Wörmann, B., Piechaczek, C., Geffers, R., Rohde, M., Lindenmaier, W., and Dittmar, K.E. (2010). Evaluating maturation and genetic modification of human dendritic cells in a new polyolefin cell culture bag system. *Transfusion*. 50, 843-855.



04.6 Molekulare Diagnostik mikrobieller Krankheitserreger

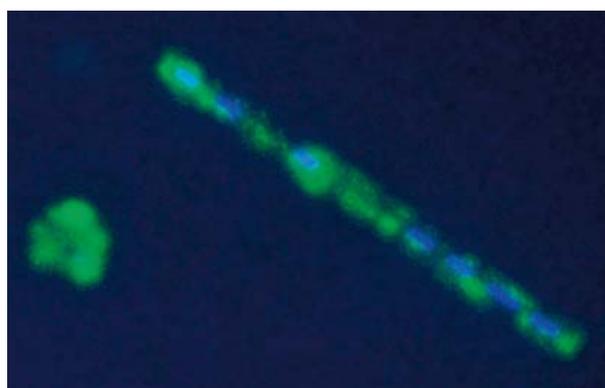
PROJEKTLEITER | Priv.-Doz. Dr. Manfred Höfle | Abteilung für Vakzinologie und angewandte Mikrobiologie | mho@helmholtz-hzi.de

PROJEKTMITARBEITER | Dr. Ingrid Brettar | Dr. Erika Harth-Chu | Karsten Henne | Leila Kalisch | Rolf Kramer

Die molekulare Diagnostik mikrobieller Krankheitserreger konzentrierte sich auf die Entwicklung und Anwendung von hochauflösenden, diagnostischen Werkzeugen zum Studium wasser- und nahrungsbürtiger bakterieller Krankheitserreger (Pathogene). Diese Werkzeuge dienen der Identifizierung einzelner Stämme, die für die Infektion einzelner Patienten verantwortlich sind oder Ausbrüche von Infektionserkrankungen verursachen. Sie basieren auf der Analyse von Markersequenzen, die mehrfach und variabel im Genom vorliegen und daher als „Variable Number of Tandem Repeats“ (VNTR) bezeichnet werden. Eine gewisse Anzahl dieser VNTR Marker wird, über das gesamte Genom verteilt, ausgewählt und erlaubt dann für eine bestimmte Bakterienart Stämme auf der klonalen Ebene zu identifizieren. Diese Methode, Multi-Loci Variable Number of Tandem Repeat Analytik (MLVA) genannt, ist ein neues Werkzeug zum Verständnis von Infektionspfaden für bakterielle Erreger aus Nahrungsmitteln und Trinkwasser. Darüber hinaus erlaubt diese genomische Fingerabdruckmethode, die Evolution und Epidemiologie von pathogenen Bakterien in Krankenhäuser und in der Umwelt zu verstehen.

Bakterielle Pathogene in Lebensmitteln Wir haben eine MLVA Methode für *Vibrio parahaemolyticus* entwickelt, die auf dem Vergleich der beiden sequenzierten Genome basiert. *V. parahaemolyticus* ist ein marines Bakterium, das nach dem Verzehr kontaminierter und unvollständig gegarter Muscheln choleraartige Durchfallerkrankungen verursacht. Dies führte zu Durchfallerepidemien im gesamten pazifischen Raum, in den USA und in letzter Zeit auch in Europa. Wir haben die Methode mit einer Reihe von chilenischen Isolaten in Zusammenarbeit mit der Universität von Santiago de Chile validiert. Klinische Isolate aus dem Süden und dem Norden von Chile unterlagen einer gemeinsamen Evolution und nur Isolate aus dem Norden Chiles wiesen eine evolutionäre Verbindung zu asiatischen Isolaten auf. Damit ist trotz des pandemischen Vorkommens von *V. parahaemolyticus* die lokale Evolution des Pathogens von Bedeutung und spielt damit auch für seine Infektiosität eine Rolle.

Bakterielle Pathogene im Wasser *Legionella pneumophila* ist ein Süßwasserbakterium, das häufig in Kühltürmen, Klimaanlage und Trinkwasserversorgungssystemen vorkommt. Es verursacht atypische Lungenentzündungen, sog. Legionellose. Das Einatmen kontaminierter Aerosole löst die Krankheit aus – mit hoher Letalität. Der Nachweis und die Identifizierung von *L. pneumophila* ist dadurch erschwert, dass diese Bakterien nur schwierig auf Agarplatten wachsen und die Tendenz haben, in einen so genannten „Lebend-aber-nichtkultivierbaren Zustand“ (engl. Viable But Non-Culturable, VBNC) zu verfallen. Wir haben die MLVA



Epifluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Trinkwasserbakterien (blaue Zellen) und Immunfluoreszenzaufnahme von *Legionella pneumophila* Serogruppe I Zellen (grün) im Biofilm eines Kühlturmes. Foto: Leila Kalisch, HZI

Methode zur spezifischen Identifizierung von *L. pneumophila* Klonen an gebrauchsfertiges Trinkwasser angepasst. Zudem wurde ein elektrophoretisches Verfahren entwickelt, das die Sequenzierung einzelner VNTRs erlaubte. Diese Analytik erlaubte den Nachweis und die Identifizierung spezifischer MLVA-Genotypen im Trinkwasser ohne Kultivierung der einzelnen Stämme. Wir konnten zeigen, dass diese Methode auf gewöhnliches Trinkwasser mit sehr niedrigem Gehalt an *L. pneumophila* Zellen (> 1 Zelle/Liter) anwendbar ist. Mit dieser kultivierungsunabhängigen Methode konnten auch mehrere nicht kultivierbare neue Klone (MLVA-Genotypen) aus dem untersuchten Trinkwasser identifiziert werden. Diese neuartige Methodik zur *in situ*-Diagnostik von pathogenen Bakterien aus der Umwelt eröffnet neue Wege zur Überwachung wasserbürtiger Erreger. Bedeutsam ist hierbei, dass nun auch retrospektiv die Quelle von Epidemien aufgedeckt werden kann. Damit leistet die neue Methode einen Beitrag zur verbesserten molekularen Epidemiologie von bakteriellen Erregern mit hoher Relevanz für die öffentliche Gesundheitsfürsorge.

Harth-Chu, E. Especio R. T., Christen, R., Guzman, C.A. & M.G. Höfle (2009) Multiple-locus variable-number of tandem-repeats analysis for clonal identification of *Vibrio parahaemolyticus* isolates using capillary electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 4079-4088

Kalisch, L. K. Henne, L. Groebe, J. Draheim, M.G. Höfle & I. Brettar (2010) Molecular analysis of the bacterial drinking water community with respect to live/dead status. *Water Science & Technology-WST* 61.1, 9-14

Kalisch, L. K. Henne, J. Draheim, I. Brettar & M.G. Höfle (2010) High-resolution *in situ* genotyping of *Legionella pneumophila* populations in drinking water by Multiple-Locus Variable-Number of Tandem Repeat Analysis (MLVA) using environmental DNA. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 6186-6195



05 Pharmazeutische Forschung

THEMENSPRECHER | Prof. Dr. Rolf Müller | Arbeitsgruppe Mikrobielle Wirkstoffe | rom@helmholtz-hzi.de | Helmholtz-Institut für Pharmazeutische Forschung Saarland (HIPS) | Abteilung für Mikrobielle Naturstoffe

Infektionskrankheiten sind eine der häufigsten Todesursachen weltweit und oft Ursache für Krankenhausaufenthalte. Die vielfältigen Faktoren, die bei einer Infektion eine Rolle spielen, verlangen eine enge interdisziplinäre Zusammenarbeit in der Antiinfektiva Forschung. Nur so können Hits aus der Wirkstoffentwicklung zu Arzneistoffen in der klinischen Anwendung weiterentwickelt und der steigenden antibiotischen Resistenz der Erreger etwas entgegengesetzt werden. Entscheidend für das Aufklären von Infektionsprozessen ist das Isolieren, Identifizieren und Optimieren von molekularen Verbindungen, die mit Infektionsprozessen wechselwirken sowie die Modellierung dieser Wechselwirkungen. Die Kenntnis des Transport- und des Wirkstoff-Target-Wechselwirkungsmechanismus ist Voraussetzung für die Optimierung des Wirkstoffs bei gleichzeitiger Verringerung der Nebenwirkungen. Die meisten kommerziellen Antiinfektiva sind von Naturstoffen oder deren Derivaten abgeleitet, die deren Pharmakophore nachahmen. Der Schwerpunkt „Pharmazeutische Forschung“ widmet sich diesen Substanzklassen mit modernen chemisch-biologischen Ansätzen, um neuartige Klassen nachhaltiger Antiinfektiva für die Wirkstoff-Entwicklungspipeline bereit zu stellen.

Der Forschungsschwerpunkt wurde nach der Gründung des „Helmholtz-Instituts für Pharmazeutische Forschung Saarland“ (HIPS) im Spätsommer 2009 neu konstituiert. Ein Ziel des HIPS ist es, durch Vertiefung der bestehenden Kooperation des HZI mit der Fachrichtung Pharmazie der Universität des Saarlandes (UdS) neue Wirkstoffe gegen Infektionskrankheiten schneller zu entwickeln. Das HIPS ergänzt dabei das Gesundheitsprogramm der Helmholtz-Gemeinschaft um die pharmazeutischen Wissenschaften und schließt die Lücke der Naturstoff-basierten Antiinfektiva Forschung in der Translationsforschung. Der Forschungsschwerpunkt setzt sich aus sieben Gruppen zusammen, die sowohl am Braunschweiger (HZI) als auch am Saarbrücker (HIPS) Standort angesiedelt sind. Die drei Abteilungen am HIPS „Mikrobielle Naturstoffe“ (MINS), „Wirkstoff-Entwicklung und -Optimierung“ (DDOP) sowie „Wirkstoff-Transport“ (DDEL) bringen nun ihre jeweilige pharmazeutische Expertise in die Infektionsforschung ein. Während MINS traditionell eine enge Kooperation mit der Forschergruppe „Mikrobielle Wirkstoffe“ (MWIS) am HZI unterhält, haben DDOP und DDEL in 2010 mit Gruppen am HZI Kooperationen aufgebaut, die bereits zur Einwerbung von Drittmitteln und zum Austausch von Wissenschaftlern geführt haben. Die HIPS-Abteilungen werden an anderer Stelle dieses Berichtes präsentiert.

Die Forschergruppen „Chemische Biologie“ (CBIO), „Medizinische Chemie“ (MCH) und „Biologische Systemanalyse“ (BISA) wurden in den Schwerpunkt „Pharmazeutische Forschung“ integriert, da sie in stark überlappenden Bereichen arbeiten: CBIO entwickelt verschiedene chemisch-biologische Ansätze, um die Aktivität und den Wirkmechanismus von Naturstoffen aufzuklären. MCH nutzt medizinisch-chemische und synthetische Zugänge, um Naturstoffe als Leitstrukturen zu optimieren und diese in signifikanten Mengen zur Verfügung zu stellen. BISA arbeitet an der Identifizierung antifungaler Stoffe, um deren Wirkmechanismen zu entziffern.

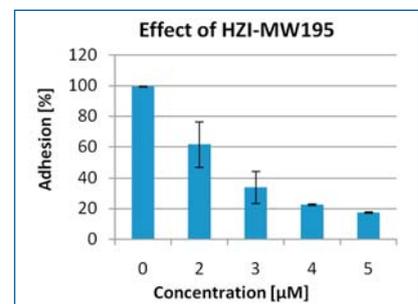
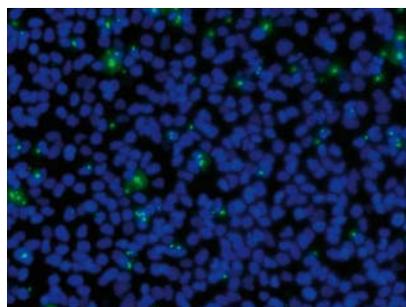
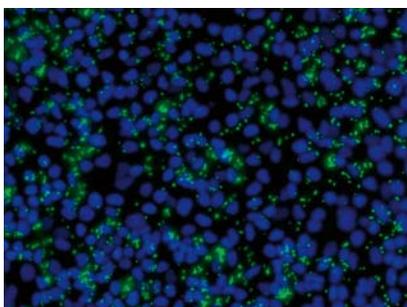
Die Abteilung „Chemische Biologie“ (CBIO) konzentriert sich auf die Aufklärung molekularer Mechanismen von Infektionskrankheiten durch niedermolekulare Wirkstoffe. Die Gruppe entwickelt neue, miniaturisierte und betreibt existierende Aktivitätsassays, um den Wirkmechanismus von Hits aus Wirkstoffbibliotheken zu bestimmen. Etwa 90.000 Substanzen befinden sich in den Bibliotheken. Sie enthalten einzigartige Sammlungen an Naturstoffen aus Myxobakterien, Verbindungen, die von Kooperationspartnern zur Verfügung gestellt wurden, kommerziell erhältlichen Bibliotheken und im Hause synthetisierten Substanzen. CBIO hat einen halbautomatischen mikroskopischen Assay entwickelt, der basierend auf Änderungen des Phänotyps Hinweise auf den Wirkmechanismus gibt. Durch eine Software-gesteuerte fotografische Auswertung der Zellen wird ein biologisches Profil der Verbindungen erzeugt, welche sich in einer hierarchischen Clusteranalyse zu bekannten Verbindungen mit ähnlichem Profil gruppieren. Das Verfahren konnte erfolgreich validiert werden und gab bereits wertvolle Hinweise auf neue Wirkmechanismen und potenziell neue Wirkstoffe. Diese sollen nun weiter untersucht werden.

In einem anderen Projekt wurde ein mikroskopischer Hochdurchsatz-Assay etabliert, um Wechselwirkungen des pathogenen Bakteriums mit menschlichen Epithelzellen zu untersuchen. Nach dem Screening von 4000 Reinsubstanzen und Mischungen konnten neue vielversprechende Verbindungen identifiziert werden. In weiteren Studien sollen diese mit humanen nasalen Primärzellen auf ihre Effizienz und in Zell-basierten Assays auf ihre Toxizität hin untersucht werden.

Die Forschergruppe „Biologische Systemanalyse“ (BISA) arbeitet mit kommensalen und persistenten Mikroorganismen. Diese Mikroorganismen wie z.B. *Candida albicans* und *Mycobacterium bovis* haben sich an das Überleben in menschlichem Gewebe angepasst und erzeugen Infektionen nur dann, wenn die Immunabwehr des Wirtes geschwächt wird. Um neue Angriffsorte für Antinfektiva zu identifizieren, simuliert die Gruppe die beim Menschen vorgefundenen Bedingungen, um mögliche Quellen für neue Wirkstoffe wie chemischen Bibliotheken, Extrakte aus Myxobakterien und kommerziell erhältliche Inhibitoren zu erschließen. In einem Projekt untersucht BISA, ob sich das Entfernen von *C. albicans* mittels Phagozyten durch Behandlung mit Kinase-Inhibitoren beeinflussen lässt. Es konnte gezeigt werden, dass alle für den Verlauf der Infektion relevanten Stufen durch chemische Substanzen kontrolliert werden, die teilweise sogar vom Organismus selbst produziert werden. In einem anderen Projekt zeigte sich, dass die Histidin-Kinase CaNik1 von *C. albicans* der Angriffsort für bestimmte Fungizide ist. Überraschenderweise erzeugt CaNik1 eine Änderung im Metabolismus, nicht aber in der Wachstumshemmung. Das Entfernen verschiedener der 9 HAMP-Domänen in CaNik1 beeinflusst in Abhängigkeit von der jeweiligen Substanz die Empfindlichkeit des Fungizids.

Die Forschergruppe „Medizinische Chemie“ (MCH) arbeitet an der Synthese von Naturstoff-basierten Antinfektiva sowie mit davon abgeleiteten Derivaten und Analoga, um deren biologisches Profil zu optimieren und Einblicke in die Struktur-Aktivitätsbeziehungen zu erlangen. So konnte kürzlich die absolute Konfiguration des Naturstoffes Chondramid C bestätigt werden. Auf dem Syntheseweg zu Coralopyronin konnte der verwandte Naturstoff Myxopyronin durch eine stereoselektive und konvergente Synthesestrategie hergestellt werden. Die erfolgreich durchgeführte Synthese von Chivosazol bestätigt den Vorschlag zur Zuordnung von 10 Stereozentren. Der Schlüsselschritt war eine ungewöhnliche Stille-Kupplung, um den Ringschluss zum Makrozyklus durchzuführen.

Der Forschungsschwerpunkt „Pharmazeutische Forschung“ vertieft die enge Zusammenarbeit der Gruppe „Mikrobielle Wirkstoffe“ (MWIS) am HZI mit der Abteilung „Mikrobielle Naturstoffe“ (MINS) am HIPS, um das Potenzial von gleitenden Bakterien für die Produktion von Naturstoffen zu steigern. Die Gruppen entwickeln Methoden der klassischen Mikrobiologie, funktionellen Genomik, Sekundärmetabolomik, des fortgeschrittenen Screenings und der Strukturaufklärung und wenden diese zur Steigerung der Naturstoffproduktion an. Zudem werden neue Assays zur Aufklärung der Zell-Zell-Kommunikation entwickelt. MWIS arbeitet eng mit den Gruppen CBIO, MCH und BISA zusammen, um die chemischen und biologischen Profile von Stämmen aus der reichhaltigen Sammlung an Myxobakterien zu erweitern.



Eine DAPI-Färbung der Epithelzellkerne und eine antikörperbasierte Markierung der Bakterien macht das Adhäsionsgeschehen für das automatische Mikroskop sichtbar. Nach Aufnahme einzelner Bilder (A+B) werden mit Hilfe eines Softwaremoduls für jedes einzelne Bild die Zellkerne sowie die adhärenen Bakterien quantifiziert. Inhibiert eine zugegebene Substanz die bakterielle Adhäsion, kann dieser Effekt anhand der Bilder quantitativ ermittelt werden. Bild B zeigt das Ergebnis nach Inkubation mit Substanz HZI-MW195 (5 µM) im Vergleich zur Kontrolle A. Die Adhäsionsstärke in Abhängigkeit der Konzentration dieser Substanz kann mit dieser Methodik zuverlässig bestimmt werden (C). (siehe Beitrag S. 112).



05.1 Mikrobielle Vielfalt und die Entdeckung neuer Naturstoffe

PROJEKTLEITER | Prof. Dr. Rolf Müller | Forschungsgruppe Mikrobielle Wirkstoffe | rom@helmholtz-hzi.de

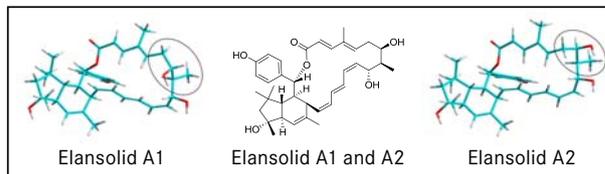
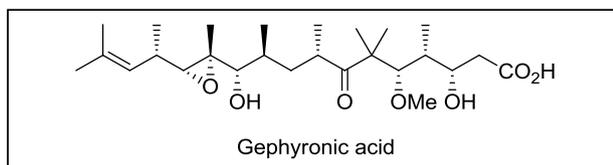
PROJEKTMITARBEITER | Dr. Klaus Gerth | Dr. Herbert Irschik | Dr. Rolf Jansen | Wolfgang Kessler |
Dr. Kathrin Mohr | Heinrich Steinmetz

Nach der Auflösung des Bereichs Naturstoffe in 2006 wurden Forschungsarbeiten mit dem Schwerpunkt Suche und Bearbeitung neuer Wirkstoffe aus gleitenden Bakterien von der neu gegründeten Arbeitsgruppe "Mikrobielle Wirkstoffe" weitergeführt. Mit der Neuorientierung 2009 liegt der Schwerpunkt unserer Arbeiten jetzt zunächst in der Rettung der vorhandenen Stammsammlung mit etwa 8500 Myxobakterien und 2800 anderen gleitenden Bakterien, sowie der Verwertung des dort noch ruhenden Potenzials an unbekanntem Wirkstoffen.

Stammsammlung: Erstmals konnten wir uns einen Überblick über die komplette Sammlung an gleitenden Bakterien am HZI verschaffen. Wir entwickelten Strategien, wie wir den wissenschaftlichen Wert der Stammsammlung erhöhen und gleichzeitig die Zahl der in den nächsten Jahren zu reaktivierenden Stämme verringern können. Bisher wurden etwa 700 Stämme bearbeitet. Es wurden Kulturextrakte zum Screening hergestellt und diese nach modernsten Methoden der HPLC MS/MS analysiert. Es wurde hochmolekulare DNA für Genomsequenzierungen und die Suche nach ruhenden PKS Gen Clustern isoliert und die Stämme physiologisch charakterisiert.

Naturstoffbiologie: Etwa 50 Myxobakterien unterschiedlicher systematischer Zugehörigkeit wurden aus frischen Bodenproben neu isoliert und auf Sekundärstoffbildung hin untersucht. Nach der Sequenzierung der 16 S rDNA zeigte sich, dass eines dieser Neuisolate nicht in die bisher bekannten Gruppen der Myxobakterien eingeordnet werden kann. Erste Hemmtests des Kulturextraktes gegen unterschiedliche Bakterien, Hefen und Pilze zeigten eine gute antibakterielle und antifungische Wirkung. Screening neuer bisher unbekannter Gruppen von Myxobakterien erhöht, wie bereits gezeigt, die Wahrscheinlichkeit, auch neuartige Antiinfektiva zu entdecken. Die Entwicklung neuer Methoden zur gezielten Isolierung unbekannter Myxobakterien mit andersartigen physiologischen Eigenschaften ist ein Schwerpunkt unserer Arbeiten.

Naturstoffchemie: Gephyronsäure wurde bereits vor 15 Jahren am HZI aus *Archangium gephyra* isoliert und seine Wirkung als Inhibitor der eukaryotischen Proteinsynthese mit einer im nanomolaren Konzentrationsbereich liegenden cytotostatischen Wirkung auf unterschiedlich humane Zelllinien hin untersucht. Mit Hilfe neuer MS Daten und mittels chemischer Derivatisierung konnte nun die Struktur revidiert und die absolute Konfiguration aller Asymmetriezentren bestimmt werden.



Durch ein unorthodoxes Isolationsverfahren für ein neues Elansolid A Isomer zeigte sich überraschenderweise, dass es eine gemeinsame Vorstufe für die Atropisomere Elansolid A1 und A2 gibt. Molekularbiologische Untersuchungen können möglicherweise einen Hinweis darauf geben, welches der Elansolid A Isomere das wirkliche Endprodukt der Biosynthese in *Chitinophaga sancti* ist, da die Umwandlung der Isomere A1 und A2 in das neue Elansolid auch unter milden Bedingungen *in vitro* erfolgt.

Fermentation: Die Fermentationseinheit bearbeitet schwerpunktmäßig zwei Themen: 1. die Bereitstellung von ausreichendem Material für die Isolierung, Strukturaufklärung und für andere Anforderungen der Pipeline bzw. von externen Partnern, sowie 2. die Optimierung der Fermentationsprozesse hinsichtlich der Produktausbeute.

Untersuchungen zur Prozessoptimierung wurden mit dem Elansolidproduzenten *Chitinophaga Fx GBF13* durchgeführt, zum Teil im Rahmen einer Masterarbeit. Hier wurde der Effekt unterschiedlicher Kohlenstoff- und Stickstoffquellen, sowie die Wirkung unterschiedlicher pH-Werte des Mediums systematisch untersucht und der Einfluss des Sauerstoffgehaltes auf die Produktion von Elansolid A1 gezeigt.



Parallele Fermentationen mit FxGBF13 unter verschiedenen pO_2 -Bedingungen Foto: HZI

- Jansen, R., Irschik, H., Huch, V., Schummer, D., Steinmetz, H., Bock, M., Schmidt, T., Kirschning, A., & Müller, R. (2010) Carolacton -a macrolide ketocarboxylic acid reducing biofilm by the caries- and endocarditis-associated bacterium *Streptococcus mutans*. *European Journal of Organic Chemistry* 7, 1284.
- Buntin, K., Irschik, H., Weissman, K. J., Luxenburger, E., Blöcker, H., & Müller, R. (2010) Biosynthesis of Thuggacins in Myxobacteria: Comparative cluster analysis reveals basis for natural product structural diversity. *Chemistry & Biology* 17, 342.
- Irschik, H., Kopp, M., Weissman, K. J., Buntin, K., Piel, J., & Müller, R. (2010) Analysis of the sorangicin gene cluster reinforces the utility of a combined hylogenetic/retrosynthetic analysis for deciphering natural product assembly by transATPKS. *ChemBioChem* 11, 1840.



05.2 Medizinische Chemie von Naturstoffen

PROJEKTLEITER | Prof. Dr. Markus Kalesse | Abteilung für Medizinische Chemie | mka05@helmholtz-hzi.de | markus.kalesse@oci.uni-hannover.de

PROJEKTMITARBEITER | Christina Brünjes | Dr. Jutta Niggemann | Dr. Evgeny Prusov | Tang Wufeng

Im Rahmen dieses Projektes sollen über chemische Synthesen Antibiotika entwickelt werden und über die Generierung von Derivaten und Analoga sowohl das biologische Profil der Leitstrukturen verbessert, als auch Aussagen über Struktur-Aktivitätsbeziehungen erhalten werden.

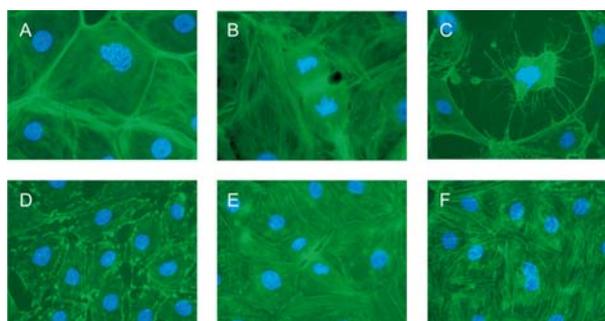
In diesem Zusammenhang konnte über die Synthese von Chondramid C die Konfiguration von Chondramid eindeutig bestätigt werden. Zusätzlich lieferten die vier Diastereomere, die für das polyketidische Segment dieses Naturstoffs synthetisiert wurden, eine Erklärung für die Nutzung der peptidischen und polyketidischen Segmente. Es konnte somit gezeigt werden, dass der polyketidische Teil des Naturstoffs ein Strukturelement zur Einstellung des optimalen Abstandes und Torsionswinkels zwischen den beiden Enden des peptidischen Segments ist.

Einen ähnlichen Ansatz verfolgen wir bei der Synthese von Corallopyronin. Hier galt es zunächst eine Synthese zu erarbeiten, die sowohl einen stereoselektiven als auch einen konvergenten Zugang zu diesem Naturstoff zulässt. Zunächst konnte der verwandte Naturstoff Myxopyronin synthetisiert werden. Wir konnten mit dieser Synthese die beiden angesprochenen Aspekte der Myxopyronin-Synthese erfolgreich bearbeiten und sind nun dabei, diese Ergebnisse auf die Synthese von Corallopyronin und dessen Derivate zu übertragen. Die im Vergleich zum Myxopyronin unterschiedliche Seitenkette konnte inzwischen synthetisiert werden, und es steht nun die Kupplung der Segmente an.

Bei der Synthese von Chlorotonil-Derivaten galt es, wasserlösliche Derivate zu erzeugen. Dafür sahen wir vor, den Dekalin-Teil des Moleküls durch eine einfache Doppelbindung zu ersetzen. Diese Synthese zeigte unerwartete Hindernisse, so dass bis heute noch keine Derivate erhalten werden konnten. Dieses Projekt wird mit veränderten Synthese-Konzepten weiter fortgesetzt.

Die Synthese von Chivasozol konnte in diesem Jahr erfolgreich abgeschlossen werden und bestätigte den von uns gemachten Strukturvorschlag und die Zuordnung der Chiralität der 10 Chiralitätszentren. Die Synthese zeichnet sich durch einen konvergenten Ansatz aus, bei dem eine ungewöhnliche Stille-Reaktion als Makrozyklisierungsschritt genutzt wurde.

Als neue Projekte wurden die Synthesen von Pellasoren und Angiolam begonnen. Für beide Synthesen soll eine asymmetrische Protonierung eines Aldehyd-Enolates als zentrale Transformation eingesetzt werden.



Einfluss von Chondramid C auf das Actin-Cytoskelett von A-498-Nierenkrebs-Zellen nach unterschiedlicher Inkubationszeit. F-Actin ist grün, Zellkerne und Chromosomen sind blau markiert. A,B: Kontrollzellen mit jeweils einer mitotischen Zelle in der Bildmitte; Metaphase (A) und Telophase (B). Zellen, die mit Chondramid C (160 nm) inkubiert wurden, zeigen anomale Metaphasen (C, nach 2 h) und einen verstärkten kontraktilen Ring in der späten Telophase (E, nach 18 h). Punktförmige Flecken aus F-Actin wurden besonders an den fokalen Adhäsionspunkten sichtbar (D, nach 4 h), Stressfasern verstärken sich und Actin-Flocken entstehen (E und F, nach 18 h).

Brodmann, T., Janssen, D., & Kalesse, M. (2010) Total synthesis of chivasazole. *Journal of American Chemical Society* **132**, 13610-13611.

Schäkel, R., Hinkelmann, B., Sasse, F., & Kalesse, M. (2010) The synthesis of novel disorazoles. *Angewandte Chemie* **122**, 1663-1666; *Angewandte Chemie International Edition* **49**, 1619-1622.

Bülow, F.L., Nicleleit, I., Girbig, A.-K., Brodmann, T., Rentsch, A., Eggert, U., Sasse, F., Steinmetz, H., Frank, R., Carlomagno, T., Malek, N.P., & Kalesse, M. (2010) Synthesis and biological characterization of argyirin. *ChemMedChem* **5**, 832-836.

05.3 Chemische Biologie von Infektionskrankheiten

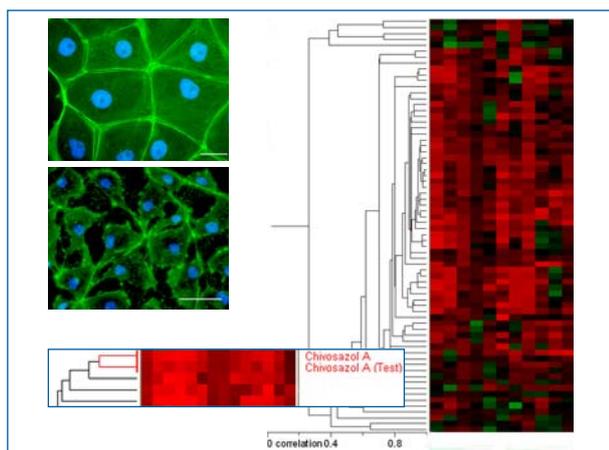
PROJEKTLEITER | Dr. Ronald Frank | Abteilung für Chemische Biologie | rfr@helmholtz-hzi.de
Dr. Florenz Sasse | Abteilung für Chemische Biologie | fsa@helmholtz-hzi.de

PROJEKTMITARBEITER | Jihad Al-Qudsi | Ulrike Beutling | Randi Diestel | Dr. Michelle Fountain | Dr. Raimo Franke
| Dr. Bernd Hofer | Denis Koska | Michael Mrosek | Dr. Irina Nickeleit | Dr. Mahtab Nourbakhsh | Dr. Marc Reboll
| Saad Shaaban | Galina Sergeev | Dennis Schwab | Dr. Dr. Werner Tegge | Dr. Peter Washausen | Marina Wöhl

Ziel dieses Projektes ist die Aufklärung der molekularen Mechanismen infektiöser Prozesse mit Hilfe niedermolekularer Wirkstoffe. Mit speziellen Testsystemen und Screening-Techniken selektieren wir bioaktive Substanzen aus chemischen Bibliotheken und analysieren ihre biologischen Wirkungen. Die Ergebnisse sollen zu neuen Antibiotika, Chemotherapeutika und Immunmodulatoren führen. Das Wissen über ihre Wirkmechanismen eröffnet neue therapeutische Wege. Als Teil der „Chemischen Pipeline“ haben wir eine Infrastruktur eingerichtet, die uns eine schnelle und effektive Suche in miniaturisierten Testsystemen erlaubt. Unsere Bibliothek umfasst etwa 90 000 Proben und beinhaltet eine einzigartige Sammlung von Naturstoffen aus Myxobakterien (siehe 05.1), Substanzen von Kooperationspartnern, käuflich erworbene Sammlungen und Verbindungen aus eigenen chemischen Synthesen. Die Infrastruktur steht über das deutsche ChemBioNet (www.chembionet.de) auch externen Forschern und für andere Anwendungen zur Verfügung.

Phänotypen charakterisieren den Wirkmechanismus

Für die Aufklärung des Wirkmechanismus einer biologisch aktiven Substanz gibt es keinen Standardweg. Jede biologisch aktive Verbindung verändert Stoffwechsel- und Signalwege im komplexen biochemischen Netzwerk einer Zielzelle. Das



Biologisch aktive Substanzen induzieren phänotypische Änderungen der Zellen, die charakteristisch für ihren Wirkmechanismus sind, hier das Beispiel Chivosazol A. Die grün gefärbten Aktinstrukturen der behandelten Zellen in B unterscheiden sich deutlich von denen der Kontrolle A. In C ist das Ergebnis einer hierarchischen Clusteranalyse mit verschiedenen Myxobakteriensubstanzen dargestellt. Der Ausschnitt D zeigt, dass Chivosazol A mit einer zweiten „blind“ gesetzten Probe der Verbindung zusammen clustert.

kann zu auffallenden Veränderung in der Morphologie der Zelle und der Zellorganellen führen oder auch zu einer anderen Proteinverteilung. Diese phänotypischen Veränderungen können über Antikörper und spezifische Farbstoffe sichtbar gemacht werden. Einer unserer Wege ist, durch Vergleich von Phänotypen Hinweise auf den Wirkmechanismus zu bekommen. Diese Methode haben wir nun durch automatische Mikroskopie und statistische Auswertung großer Datenmengen verstärkt. Über automatische Mikroskopie kann man eine große Anzahl Bilder von behandelten Zellen aufnehmen, durch Software-basierte Bildanalyse auswerten und so ein Profil der biologisch aktiven Substanz erstellen. Der Profilvergleich bekannter und unbekannter Verbindungen liefert dann Hinweise auf den Wirkmechanismus der neuen Verbindung. Durch Software-gestützte Methoden, wie hierarchischen Clusteranalysen gruppieren sich Substanzen, die den gleichen Wirkmechanismus haben. Dadurch haben wir für unbekannte Substanzen wertvolle Hinweise auf ihre potenziellen Wirkmechanismen erhalten. Erste Folgeuntersuchungen konnten die Hinweise bestätigen.

Inhibitoren der Adhärenz von *Staphylococcus aureus* an menschliche Epithelzellen

Im Rahmen des vom BMBF geförderten Projekts „SkinStaph“ wurde ein hochdurchsatzfähiger Adhäsionsassay für die Suche nach neuen Inhibitoren der Interaktion zwischen dem human-pathogenen Bakterium *Staphylococcus aureus* und menschlichen Epithelzellen etabliert. Wir verwenden eine sehr zuverlässige neue Methode, die auf automatischer Mikroskopie basiert. Epithelzellen werden nach Zugabe von Wirkstoffkandidaten mit den Bakterien inkubiert, die nicht-adhärenenten Bakterien entfernt und die Zellen fixiert. Dann werden sowohl die Kerne der Epithelzellen als auch die Bakterien für die Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht. Das automatisierte Mikroskop nimmt mehrere Bilder pro Wirkstoffkandidat auf, erfasst quantitativ die Zellkerne und gibt einen Wert für die Größe der Fläche der fluoreszierenden Bakterien aus. Die bakterielle Fläche ist proportional zur Anzahl der Epithelzellen, und es können somit Substanzen identifiziert werden, die eine Abnahme adhärenenten Bakterien verursachen. Screening-Durchläufe mit etwa 4.000 Substanzen und Substanzgemischen lieferten vielversprechende Kandidaten. Aussichtsreiche Substanzen werden derzeit in weiteren Studien, z.B. mit humanen nasalen Primärzellen, auf ihre Wirksamkeit sowie in zellbasierten Assays auf ihre Toxizität überprüft.



05.4 Identifizierung molekularer Angriffspunkte von Antiinfektiva

PROJEKTLEITER | Prof. Dr. Ursula Bilitewski | Arbeitsgruppe Biologische Systemanalyse | ubi@helmholtz-hzi.de

PROJEKTMITGLIEDER | Dr. Nina Klippel | Dr. Bianca Lüderitz | Anna Buschart | Shuna Cui | Mohammed El-Mowafy | Daniela Evers | Katja Gremmer | Rabeay Hassan | Hani Kaba | Carolin Lewark | Dörthe Sokolis

Zur Behandlung von Infektionen sind neue Wirkstoffe nötig, die neue Angriffspunkte in den Organismen nutzen, um bereits bestehende Antibiotika-Resistenzen zu umgehen. Wir haben für unsere Untersuchungen kommensale und persistente Mikroorganismen ausgewählt: die Hefe *Candida albicans* und das Bakterium *Mycobacterium bovis* (BCG) als Stellvertreter für den Tuberkuloseerreger *Mycobacterium tuberculosis*. Diese Mikroorganismen sind an das Überleben in Gegenwart von menschlichen Zellen angepasst, und Infektionen entstehen vor allem dann, wenn die Immunabwehr des Menschen geschwächt ist.

Histidinkinasen als Angriffspunkte für Antiinfektiva

Histidinkinasen sind in Bakterien, aber auch in Pilzen zu finden und fungieren häufig als Sensorproteine für Umgebungsbedingungen. In früheren Untersuchungen hatte sich die als CaNik1 bezeichnete Histidinkinase von *C. albicans* als Angriffspunkt für die myxobakteriellen Sekundärmetabolite Ambruticin VS3 und Jerangolid A erwiesen. In diesem Protein konnten wir neben den für die enzymatische Aktivität notwendigen Zentren noch 9 seriell angeordnete sogenannte HAMP-Domänen identifizieren. Durch gezielte Deletion einiger dieser Domänen konnten wir zeigen, dass sie an der Sensitivität für Fungizide beteiligt sind. Für weitere funktionelle Studien hatten wir das Gen in der gut untersuchten Bäckerhefe *S. cerevisiae* funktionell exprimiert und dort Genexpressionsstudien durchgeführt. Diese zeigten, dass durch CaNik1 in Bäckerhefe der Signalweg aktiviert wird, der die osmotische Stressabwehr reguliert, was in der Folge auch die Regulation des Zellzyklus und damit des Zellwachstums betrifft.

Suche nach neuen Angriffspunkten für Antiinfektiva

Candida albicans besiedelt als kommensaler Organismus vor allem Schleimhäute von Menschen, befindet sich also in direktem Kontakt mit Epithelzellen. Bei systemischen Infektionen dringt sie in tieferliegendes Gewebe ein und wird über die Blutbahn verbreitet. Dies ist mit Morphologiewechseln zwischen Hefe- und Hyphenform verbunden. An der Infektionsabwehr sind vor allem Phagozyten, wie Neutrophile und Makrophagen, beteiligt. Auch bei der Abwehr von Lungeninfektionen durch Mykobakterien sind Makrophagen wesentlich beteiligt. Allerdings können die Bakterien im Innern von Makrophagen als persistierende, ruhende Organismen überleben und sich so antibakteriellen Therapien entziehen.

Um neue Angriffspunkte für Antiinfektiva zu identifizieren, ahmen wir im Labor die Bedingungen nach, die die Organismen im Menschen vorfinden. Wir prüfen, ob wir durch chemische Substanzen die Wirkung der Phagozyten unter-



Elektronenmikroskopische Aufnahme der Wechselwirkung zwischen der Hefe *Candida albicans* und Epithelzellen (Zelllinie A 431) in Gegenwart des Peptids LL37 (M. Rohde). LL 37 gehört zu den antimikrobiellen Peptiden, hemmt das Wachstum von *C. albicans* kaum, fördert jedoch die Adhäsion der Hefe an die menschlichen Zellen. Bei einer Inkubationszeit von 6 h unter Zellkulturbedingungen bildet *C. albicans* Hyphen, die auch in den Epithelzellen zu finden sind und in ihnen weiter wachsen.

Photo: HZI, Rohde

stützen, bei *C. albicans* den Morphologiewechsel und bei Mykobakterien das Überleben im Ruhezustand verhindern können. Als Quellen für potenzielle neue Wirkstoffe nutzen wir Bibliotheken chemischer Substanzen, myxobakterielle Extrakte und kommerziell verfügbare Inhibitoren. Dabei konnten wir zeigen, dass alle infektionsrelevanten Schritte durch chemische Substanzen beeinflussbar sind. Diese Substanzen können zum Teil von den Organismen selber gebildet werden. So bilden menschliche Zellen Peptide, die die Adhäsion von *C. albicans* auf Oberflächen verändern, vor allem an Bestandteile der extrazellulären Matrix. Die Bildung von Hyphen wird unter anderem durch Substanzen unterdrückt, die für *C. albicans* Funktionen als Quorum Sensing-Verbindungen haben. Außerdem entdeckten wir Genistein, einen bekannten Inhaltsstoff der Sojabohne, als Phagozytose-aktivierende Substanz.

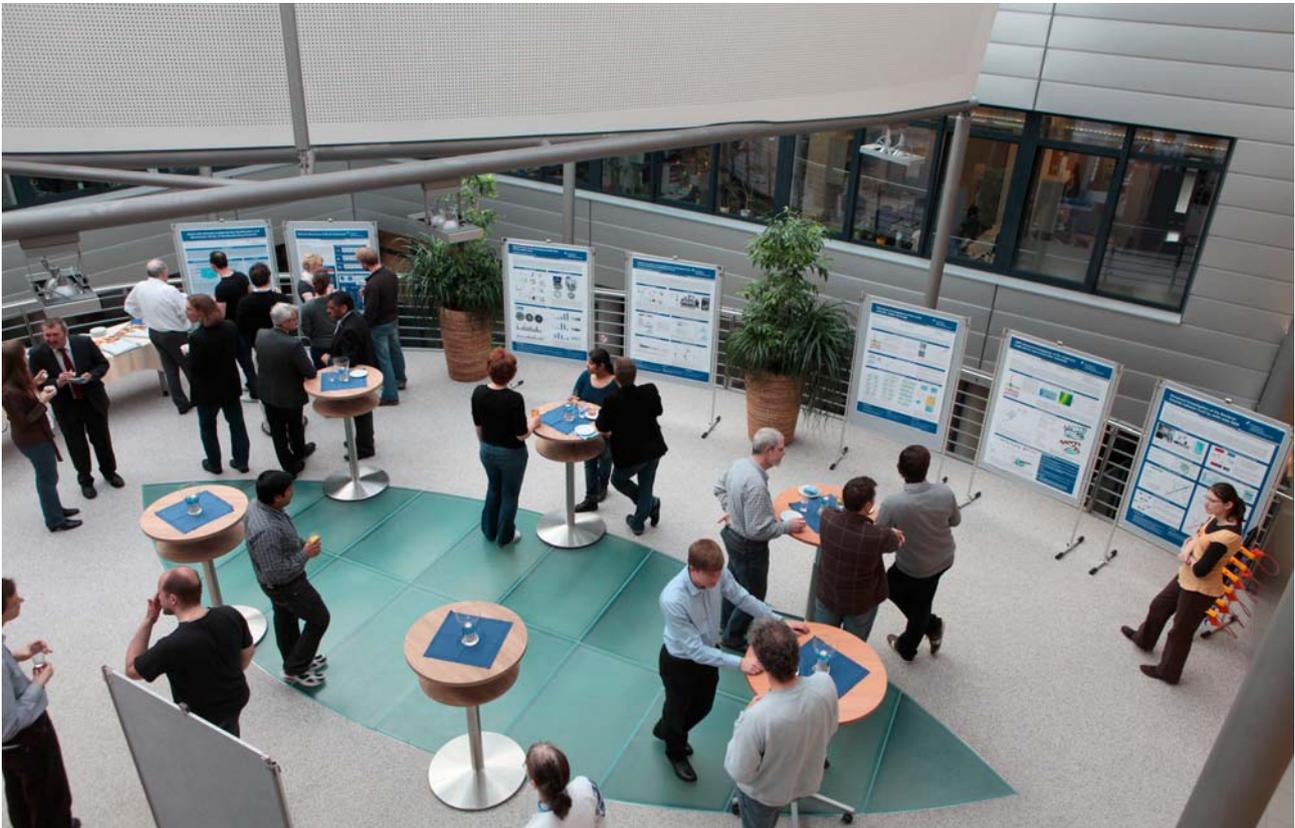
Wesolowski, J., Hassan, R.Y.A., Reinhardt, K., Hodde, S. & Bilitewski, U. (2010) Antifungal compounds redirect metabolic pathways in yeasts: Metabolites as indicators of modes of action, *Journal of Applied Microbiology* **108**, 462 - 471

Klippel, N., Cui, S., Gröbe, L. & Bilitewski, U. (2010) Deletion of the *Candida albicans* histidine kinase gene *CHK1* improves recognition by phagocytes through an increased exposure of cell wall β -glucans, *Microbiology* **156**, 3432 - 3431

Buschart, A., Gremmer, K., v.d.Heuvel, J., Müller, P.P. & Bilitewski, U. (2011) Repetitive HAMP domains at the N-terminus of the CaNik1 histidine kinase of *Candida albicans* mediate specific interactions with fungicides, *Molecular Microbiology*, submitted

Neue Projektgruppen

Das HZI hat jungen Forschern mit sehr guten Ideen die Möglichkeiten gegeben, ihre Forschung im HZI durchzuführen, wenn das Ziel ihrer Forschungsarbeiten im Rahmen der F&E-Ziele des Zentrums gelegen hat. Seit 2009 haben neue Projektgruppen ihre Arbeit am HZI aufgenommen. Während der kommenden 5 Jahre werden sie versuchen neue Wege in der Forschung zu gehen und entsprechend hervorragende Ergebnisse zu präsentieren. Die ersten Resultate und weitere Ideen dieser 2. Generation von neuen Projektgruppen werden auf den nächsten Seiten vorgestellt.



Neue Projektgruppen präsentieren Ihre Arbeiten auf der Plattform des Gründerzentrums des HZI. Das Foto wurde während eines Besuchs des Nobelpreisträgers für Chemie, Prof. Dr. Kurt Wüthrich, ETH Zürich (Schweiz)/La Jolla (USA), aufgenommen. Prof. Wüthrich (links, weißes Hemd) diskutiert mit einem Nachwuchswissenschaftler dessen Ergebnisse. Foto: HZI



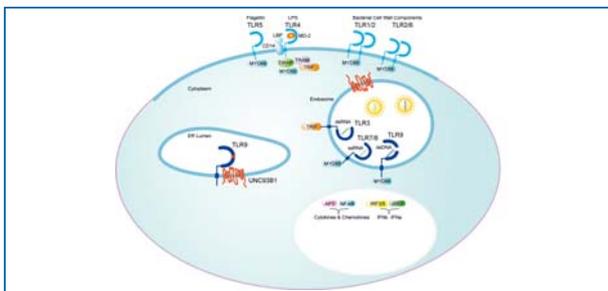
01 Regulation und herpesvirale Immunmodulation von Toll-like Rezeptoren

PROJEKTLEITERIN | Dr. Melanie M. Brinkmann | Nachwuchsgruppe Virale Immunmodulation | mbr10@helmholtz-hzi.de

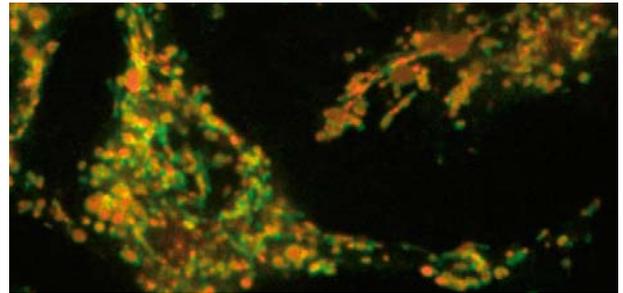
PROJEKTMITARBEITER | Dr. Bettina Gruhne | Elisa Reimer

Herpesviren Herpesviren etablieren lebenslange, persistierende Infektionen. Immunkompetente Individuen sind in der Lage, herpesvirale Infektionen zu kontrollieren. Bei immun-supprimierten Menschen wie Transplantatempfängern oder AIDS-Patienten kann es jedoch zu schwerwiegenden Komplikationen kommen. Eine Infektion mit dem Betaherpesvirus Cytomegalievirus (CMV) während der Schwangerschaft ist die häufigste Ursache für Virus-induzierte Fehlbildungen des Fötus. Die humanen Gammaherpesviren Epstein-Barr Virus (EBV) und Kaposi's Sarkom-assoziiertes Herpesvirus (KSHV) verursachen Tumorerkrankungen. Um neue prophylaktische und strategische Therapien gegen herpesvirale Infektionen zu entwickeln, ist es wichtig zu verstehen, wie Herpesviren von unserem Immunsystem erkannt werden und wie sie die Immunantwort des Wirtes modulieren, um ihrer Eliminierung zu entgehen.

Angeborene Immunantwort Das angeborene Immunsystem erlaubt eine schnelle und potente antivirale Immunabwehr und spielt eine wichtige Rolle für die Induktion der erlernten Immunantwort. Eine Familie von Sensoren des angeborenen Immunsystems sind die sogenannten Toll-like Rezeptoren (TLR). TLR9 spielt eine wichtige Rolle für die Detektion von Herpesviren und induziert nach Bindung viraler DNA eine antivirale Immunantwort. Das zelluläre Membranprotein UNC93B ist essenziell für die Funktion von TLR9: es eskortiert TLR9 vom Ort seiner Synthese, dem endoplasmatischen Retikulum, in das endolysosomale Kompartiment. Dort trifft TLR9 auf die DNA invasiver, pathogener Mikroorganismen und initiiert eine Signalkaskade, die zur Ausschüttung von Zytokinen und Interferonen führt. Die von TLR9 induzierte



Das Membranprotein UNC93B interagiert mit Toll-like Rezeptor 9 (TLR9) im endoplasmatischen Retikulum und eskortiert TLR9 in das endolysosomale Kompartiment. Dort trifft TLR9 auf die DNA invasiver, pathogener Mikroorganismen. Im Endolysosom wird TLR9 proteolytisch gespalten und induziert anschließend eine Signalkaskade, die zu einer antiviralen Immunantwort führt. Copyright Melanie M. Brinkmann



TLR9 lokalisiert in Endolysosomen nach Stimulation mit TLR Agonisten. Primäre Makrophagen wurden aus TLR9-GFP transgenen Mäusen isoliert. Lebende Zellen wurden mit LPS stimuliert und mit einem "spinning disc" konfokalen Laser-mikroskop in Echtzeit analysiert. Endolysosomen wurden mit Lyotracker gefärbt (in rot). Copyright Melanie M. Brinkmann

Signalkaskade ist bereits gut charakterisiert, jedoch ist die Regulation des intrazellulären Transportes des UNC93B-TLR9 Komplexes in infizierten Immunzellen nicht gut untersucht.

Das Projekt Unsere Forschung fokussiert auf die Mechanismen der Herpesviren, mit denen sie der Erkennung durch das angeborene Immunsystem des Wirtes entgehen. Unsere Daten zeigen erstmals, dass Herpesviren die Funktion der Toll-like Rezeptoren inhibieren können. Wir wollen die verantwortlichen herpesviralen Proteine identifizieren und den Mechanismus entschlüsseln, mit dem diese Proteine die Toll-like Rezeptoren außer Gefecht setzen. Ferner erforschen wir die Regulation des intrazellulären Transportes des UNC93B-TLR9-Komplexes nach Infektion primärer Immunzellen mit Herpesviren. Mit fluoreszierenden Herpesviruspartikeln und fluoreszierenden TLR9- und UNC93B- Proteinen werden wir den intrazellulären Transport in Echtzeit mit konfokaler Lasermikroskopie untersuchen. In einem biochemischen Ansatz, in dem wir herpesvirale DNA als Köder nutzen werden, wollen wir weitere zelluläre DNA-Sensoren identifizieren, die neben TLR9 für die Erkennung von Herpesviren wichtig sind. Wir haben weitere zelluläre Interaktionspartner des UNC93B-Proteins identifiziert und werden die Rolle dieser Proteine für die Regulation des intrazellulären Transportes vom endoplasmatischen Retikulum zum Endosom des UNC93B-TLR9-Komplexes charakterisieren.

Boyoun Park, Melanie M. Brinkmann, Eric Spooner, Clarissa C. Lee, You-Me Kim and Hidde L. Ploegh, (2008) *Nature Immunology*, 9 (12), 1407-1414

You-Me Kim, Melanie M. Brinkmann, Marie-Eve Paquet and Hidde L. Ploegh (2008) *Nature*, 452 (7184), 234-238

Melanie M. Brinkmann, Eric Spooner, Kasper Hoebe, Bruce Beutler, Hidde L. Ploegh and You-Me Kim, (2007) *Journal of Cell Biology*, 177 (2), 265-275



02 System-Immunologie

PROJEKTLEITER | Prof. Dr. Michael Meyer-Hermann | Abteilung für System-Immunologie | mmh10@helmholtz-hzi.de

PROJEKTMITARBEITER | Dr. Marc Thilo Figge | Dr. Valerii Sukhorukov | Dr. Arndt Telschow | Sebastian Binder | Jaber Dehghany | Harald Kempf

System-Immunologie Was ist System-Biologie und wofür brauchen wir sie? Es ist nicht möglich die Funktionalität eines Systems aus der bloßen Kenntnis seiner Konstituenten her zu leiten, die wir aus den „omics“-Ansätzen kennen. Die entscheidende Frage ist, wie diese Konstituenten miteinander wechselwirken und wie sie zusammen ein funktionales Konzept wie einen Organismus entstehen lassen. Der Schlüssel liegt in der Dynamik des betrachteten Systems. System-Immunologie ist die Wissenschaft, in der mathematische Modelle von der Dynamik von komplexen Systemen im Bereich Gesundheit entwickelt werden. Die Zukunft der Forschung in der Biologie wird auf einer iterativen Diskussion zwischen Theorie und Experiment fußen, die uns die Physik bereits erfolgreich vorgelebt hat.

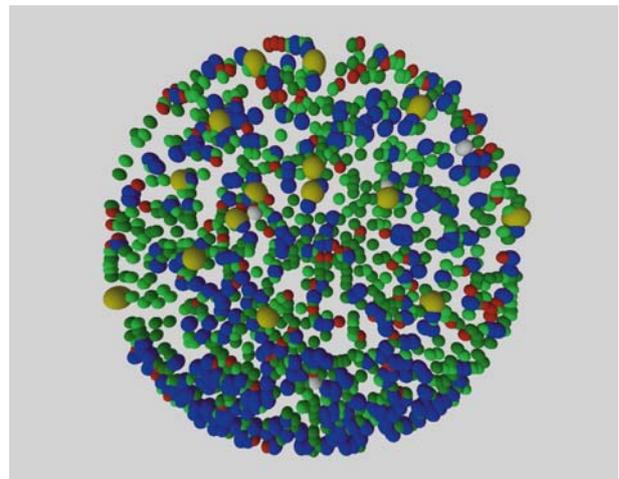
Methodik Da die Kenntnis der Konstituenten eines biologischen Systems allein seine Mechanismen und Funktionsweise nicht zu verstehen erlaubt, müssen wir von phänomenologischen Beschreibungen des Gesamtsystems starten. Diese sollten so einfach wie möglich und so komplex wie nötig sein, um den Vergleich mit aktuellen experimentellen Daten zu ermöglichen. In einem iterativen Optimierungsprozess werden die Modellannahmen so lange evolviert bis das *in silico*- und das *in vivo*-System das gleiche Verhalten aufweisen. Weichen Theorie und Experiment voneinander ab, wird die System-Immunologie für die Forschung fruchtbar: Entweder muss das Modell erweitert oder vorhandene Annahmen neu überdacht werden. In beiden Fällen wird das Wissen über die Funktionsweise des biologischen Systems verbessert. Der Vorteil dieses phänomenologischen Ansatzes ist, dass die jeweils erreichte mathematische Beschreibung immer die Funktionalität des beschriebenen Systems garantiert. Das ultimative Ziel dieses Ansatzes ist es, auf der Basis eines zunehmend komplexen Modells des biologischen Systems (i) neue Experimente vorzuschlagen, die über spezifische Fragen Aufschluss geben, (ii) Ergebnisse von Experimenten vorherzusagen, um das derzeitige Wissens zu überprüfen und (iii) optimierte Behandlungsstrategien in deregulierten Systemen vorherzusagen.

Beispiel Entwicklung spezifischer Antikörper Das Immunsystem beinhaltet eine spezifische Umgebung, das Keimzentrum (GC), in dem B Zellen (BC) zum Mutieren des Antikörpers angeregt werden. Anschließend durchlaufen die mutierten BC einen Selektionsprozess, um dann die neuen hochaffinen Antikörper zu produzieren oder das Immungedächtnis aufzubauen.

Man war der Überzeugung, dass die begrenzte Verfügbarkeit von Antigen die Selektion kontrolliert. Wir haben ein mathematisches Modell für die Dynamik der GC entwickelt und vorhergesagt, dass nicht das Antigen sondern eine affinitäts-

abhängige TC-Hilfe limitierend sein muss [1]. Diese Vorhersage wurde in einer Reihe von Experimenten nachgewiesen [2] und damit ein neues Modell der GC Reaktion induziert. Auch Toll-like-Rezeptor-4 (TLR4) beeinflusst die Entwicklung von GC. Wir haben *in silico* getestet, wie sich eine Störung des TLR4 auf die GC Dynamik auswirkt, und vorhergesagt, dass die Mutationsrate von TLR4 reduziert werden muss. Diese Vorhersage wurde experimentell bestätigt [3].

Ausrichtung Die neue Abteilung System-Immunologie am HZI wird sich, neben der Fortführung von etablierten Forschungsthemen wie der adaptiven Immunantwort und Diabetes, mit der Modellierung von dynamischen Systemen im Bereich der Infektions- und Entzündungsforschung und der Etablierung von neuen Kollaborationen beschäftigen.



In silico-Agenten-basierte Simulation einer Keimzentrumreaktion. Ein 20 microns dicker Schnitt durch ein Keimzentrum am Tag 5 nach eingesetzter Proliferation. Jedes Objekt repräsentiert eine Zelle: Sich teilende und mutierende BC (blau), nicht-teilende Ig-exprimierende BC (dunkelgrün), BC mit positiven Signalen von FDC (hellgrün), Plasmazellen (weiß), T folliculäre Hilfszellen (rot), FDC (gelb) wobei die Dendriten nicht gezeigt sind. Alle Zellen wechselwirken nach Regeln, die dem heutigen Kenntnisstand entsprechen, und bewegen sich in Antwort auf Chemokine (nicht gezeigt) und in Übereinstimmung mit den Resultaten von neuen 2-Photon-intravital Experimenten. Zuvor publiziert in [4].

[1] Meyer-Hermann, M., Figge, M.T., & Toellner, K.M. (2009) *Trends in Immunology* 30, 157-164.

[2] Victora, G.D., Schwickert, T.A., Fooksman, D.R., Meyer-Hermann, M., Dustin, M.L., & Nussenzweig, M.C. (2010) *Cell* 143, 592-605.

[3] Garin, A., Meyer-Hermann, M., Contie, M., Figge, M.T., Buatois, V., Gunzer, M., Toellner, K.-M., Elson, G., & Kosco-Vilbois, M.H. (2010) *Immunity* 33, 84-95. 1: shared first author.

[4] Figge, M.T., Garin, A., Gunzer, M., Kosco-Vilbois, M., Toellner, K.-M., & Meyer-Hermann, M. (2008). *Journal of Experimental Medicine* 205, 3019-3029.



03 Die Nationale (“Helmholtz”) Kohorte

PROJEKTLEITER | Priv.-Doz. Dr. Frank Pessler | Abteilung für Infektionsgenetik | fpe09@helmholtz-hzi.de

PROJEKTMITARBEITER | Dr. Manas Akmatov | Matthias Preuß

Prospektive Kohortenstudien Der Anstieg chronischer Krankheiten wie Krebs, Arteriosklerose, Diabetes, Arthrose und Morbus Alzheimer stellt in den Industrieländern eine stetig wachsende Herausforderung für die Gesundheitsversorgung dar. Die Ursachen dieser Erkrankungen sind durch Umwelt, Lebensstil und genetische Faktoren bedingt. Epidemiologen möchten Strategien für die Früherkennung von Risikofaktoren und Erkrankungen entwickeln. Prospektive Kohortenstudien sind hierfür das wichtigste Werkzeug, da sie Risikofaktoren und Biomarker schon im präklinischen Stadium erfassen können.

Die Nationale “Helmholtz” Kohorte Die Helmholtz-Gemeinschaft hat eine deutschlandweite Kohortenstudie initiiert, um den Herausforderungen des 21. Jahrhunderts in der Gesundheitsversorgung zu begegnen. Letztlich sollen 200.000 Freiwillige in ganz Deutschland untersucht und befragt und anschließend 10 bis 20 Jahre lang auf die Entwicklung von Krankheiten hin beobachtet werden. Außerdem wird in der Nähe von München eine Biobank gebaut werden. Eine Anschubförderung der Helmholtz-Gemeinschaft von 20 Millionen Euro wird von den fünf beteiligten Helmholtz-Zentren u.a. genutzt, um die Studienprotokolle für diese größte Gesundheitsstudie in der deutschen Geschichte zu planen und zu pilotieren, Studienzentren zu etablieren und Mitte 2012 mit der Rekrutierung und Phänotypisierung der Probanden zu beginnen.

Das HZI unterstützt die Kohorte u.a. wie folgt:

- Als Mitglied des Rekrutierungs-Clusters Nord-West-Deutschland werden wir 2012-2017 10.000 Teilnehmer aus dem Braunschweig-Hannoverschen Raum rekrutieren.
- Wir entwickeln und optimieren Protokolle (SOPs) für die Gewinnung und Aufbewahrung von Biomaterialien, insbesondere für Nasenabstriche, Speichel, Leukozyten und Stuhl.
- Wir initiieren und entwickeln das infektiologisch/immunologische Programm der Kohorte. Hier verfolgen wir zwei Wege: erstens geht es um Mikroorganismen

als Risikofaktoren für die Entstehung von chronischen Krankheiten wie kardiovaskuläre und neurodegenerative Erkrankungen; zweitens geht es um Risikofaktoren für den Erwerb von akuten und chronischen Infektionen und Immunstörungen.

- Wir führen neuartige epidemiologische Forschungsmethoden für die Untersuchung von Infektionen ein. Zum Beispiel untersuchen wir, ob Studienteilnehmer Biomaterialien für diagnostische Untersuchungen (z.B. Nasenabstriche und Stuhlproben) zuverlässig selbst gewinnen und an das Labor schicken können. Hier untersuchen wir auch die Nutzbarkeit von modernen Kommunikationsmethoden wie SMS und Email, um die Studientreue zu gewährleisten und Informationen über symptomatische Infektionen in Echtzeit zu bekommen.
- Wir beurteilen und adaptieren neuartige Biomarker (z.B. microRNAs) und biostatistische Methoden.

Netzwerke innerhalb der Kohorte

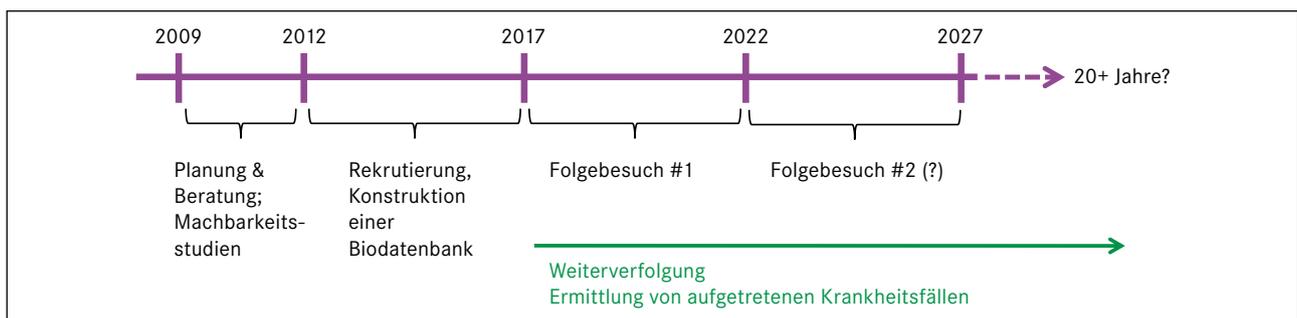
Wir vertreten das HZI im nationalen Epidemiologischen Planungskomitee der Kohorte, im Schreibkomitee für die 2011 anstehende internationale Begutachtung, sowie in den thematischen Arbeitsgruppen „Infektion und Immunität“, „Bewegungsapparat“, „Biobank“ und „Fragebogen“. In der aktuellen Machbarkeitsphase der Kohorte koordinieren wir eine Multicentre-Studie über neuartige infektionsepidemiologische Messinstrumente.

Akmatov, M.K. & Pessler F. (2011) The potential of self-collected nasal swabs to detect infection and colonization in population-based epidemiological studies. *International Journal of Infectious Diseases* (accepted for publication).

Akmatov, M.K., Pessler, F. & Brzoska P. (2011) Attitudes among women in low- and middle-income countries towards people living with HIV/AIDS – the situation after three decades of AIDS. *BMC Public Health* (under review).

Ogdie, A., Li, J., Dai, L., Yu, X., Diaz-Torne, C., Akmatov, M., Schumacher, H.R., & Pessler, F. (2010) Identification of broadly discriminatory synovial tissue biomarkers with binary and multicategory receiver operating characteristic analysis. *Biomarkers* **15**(2), 183-90.

Slansky, E., Li, J., Häupl, T., Morawietz, L., Krenn, V., & Pessler, F. (2010) Quantitative determination of the diagnostic accuracy of the synovitis score and its components. *Histopathology* **57**(3), 436-443.



Aktueller Zeitplan für Planung, Rekrutierung und Nachbeobachtung der Kohorte. Grafik: HZI



04 Die Alterung des Immunsystems

PROJEKTLEITER | Dr. Dr. Luka Cicin-Sain | Nachwuchsgruppe Immunalterung und chronische Infektionen | lcs09@helmholtz-hzi.de

PROJEKTMITARBEITER | Dr. Linda Ebermann | Iryna Dekhtiarenko | Anja Drabig | Thomas Marandu | Ilona Paprotta | Franziska Schreiner

Die langsame Verschlechterung des Immunsystems bei älteren Menschen wird als Immunoseneszenz bezeichnet. Die altersbedingten Veränderungen betreffen dabei sowohl die angeborene als auch die erworbene (adaptive) Immunabwehr und inzwischen ist bekannt, dass die Funktion des adaptiven Immunsystems mit dem Alter abnimmt. Naïve Lymphozyten besitzen ein breites klonales Repertoire, mit dem sie eine große und divergente Zahl von potenziellen Pathogenen erkennen. Alterung führt zu einer Reduktion der naiven T-Zellen und damit auch der Diversität der T-Zellklone. Die Folge: eine erhöhte Anfälligkeit gegen neue Infektionen und schlechterer Impfschutz. Somit ist der Verlust der klonalen Diversität im Pool der T-Lymphozyten ein charakteristisches Merkmal der Immunoseneszenz.

Die Ursachen der Immunoseneszenz sind noch weitgehend ungeklärt, klar ist nur die Bedeutung der Thymusrückbildung. Welche Rolle der oxidative Metabolismus und Umgebungsfaktoren spielen ist unklar. Verstehen wir dieses Zusammenspiel, erlaubt uns das, neue Therapien zu entwickeln, die die Alterung des Immunsystems verlangsamten oder umkehren.

Das Cytomegalievirus Das Cytomegalievirus (CMV) ist ein ubiquitäres Pathogen, mit dem weltweit die Mehrheit der Bevölkerung infiziert ist, und das bei immunsupprimierten Patienten zu lebensbedrohlichen Komplikationen führen kann. Die chronisch persistierende CMV-Infektion stimuliert dauerhaft das Immunsystem durch permanente Antigen-Belastung. Dadurch wird das Repertoire der T-Zell-Gedächtniszellen vermindert. Erwachsene (und hier vor allem ältere Erwachsene) zeigen eine starke CMV-spezifische T-Zellantwort sowie eine hohe Zahl CMV-spezifischer CD8-Zellen. Das Verständnis der Mechanismen hinter dieser einzigartigen starken Immunantwort erlaubt uns, homöostatische Prozesse zu erforschen, die die Interaktion eines Wirtes mit seiner mikrobiologischen Umgebung steuern.

Das Projekt Epidemiologische Langzeitstudien zeigen, dass ältere Erwachsene einen immunologischen Risikophänotyp mit einer höheren Sterblichkeitsrate aufweisen und dass dieser Phänotyp mit dem serologischen Status für CMV koinzidiert. Trägt ein ubiquitäres Pathogen, wie CMV, zur Alterung des Immunsystems bei, ist das für unser Verständnis der Immunoseneszenz von großer Relevanz.

Vorläufige Untersuchungen demonstrieren, dass CMV-infizierte Tiere eine schwächere CD8-Antwort auf Superinfektionen mit neu entstehenden Pathogenen wie Influenza H1N1 oder dem West-Nil-Virus zeigen als nicht infizierte Kontrolltiere. Da die CMV-Infektion zur Alterung des Immunsystems beiträgt, analysieren wir die Konsequenzen einer persistierenden Virusinfektion auf das Wirtsimmunsystem. Wir wollen zum Einen die zellulären und molekularen Mechanismen einer chronischen Herpesvirus-Infektion und zum Anderen ihre grundsätzliche biologische Relevanz für die Immunalterung untersuchen.

I. Mechanismen: Es ist unklar, ob die schwache CD8-Antwort aus intrinsischen Veränderungen in der CD8-Zellpopulation oder einer veränderten immunologischen Umgebung resultiert. Klarheit sollen adoptive Transferexperimente bringen. Die Rolle einer persistierenden Antigenstimulation wird dabei über rekombinante Viren mit konditionierter und/oder spezifischer Expression von immundominanten T-Zellantigenen untersucht.

II. Relevanz: Es ist unklar, ob die schwache Immunantwort ausschließlich auf die Belastungsinfektionen in CMV-infizierten Wirten oder auf generelle Defizite zurück zu führen ist. Wir analysieren, ob chronische Infektionen zu einer schwächeren Immunantwort auch auf nicht-virale Pathogene, wie a) bakterielle Pathogene, wie z. B. *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium bovis*, etc., oder b) Tumorentigene, führen.

1.Cicin-Sain, L., Bubic, I., Ruzsics, Z., Schnee, M., Mohr, C., Jonjic, S. & Koszinowski, U.H. (2007) Targeted deletion of regions rich in immune-evasive genes from the cytomegalovirus genome as a novel vaccine strategy. *Journal of Virology* **81**(24),13825-34.

2.Cicin-Sain, L., Messaoudi, I., Park, B., Currier, N., Planer, S., Fischer, M., Tackitt, S., Nikolich-Zugich, D., Legasse, A., Axthelm, M.K., Picker, L.J., Mori, M. & Nikolich-Zugich, J. (2007). Dramatic Increase in Naïve T-Cell Turnover is Linked to Loss of Naïve T-cells from Old Primates. *PNAS* **104**(50),19960-5.

3.Cicin-Sain, L., Smyk-Pearson, S., Fisher, M.B., Currier, N., Koudelka, C., Nikolich-Zugich, D., Legasse, A., Tackitt, S., Axthelm, M.K., Mori, M., Lewinsohn, D., & Nikolich-Zugich, J. (2010) Loss of naïve T-cells and repertoire constriction predict poor response to vaccination in old primates. *Journal of Immunology* **184**(12), 6739-45.



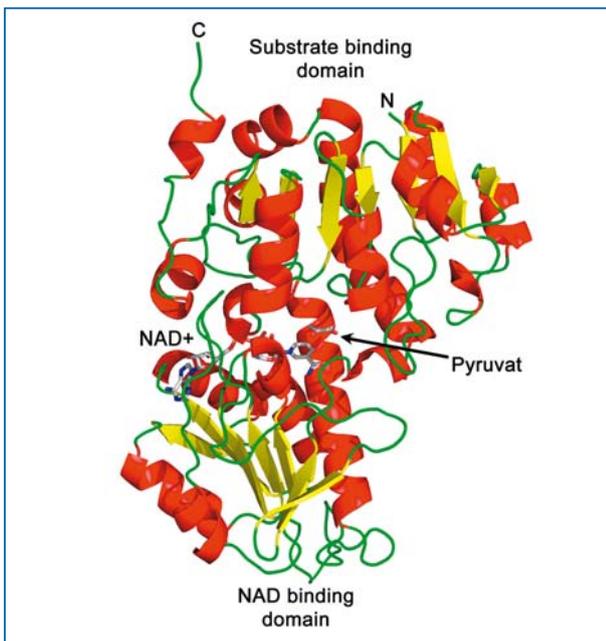
05 Entwicklung neuer Diagnostika und Therapeutika zur Kontrolle und Prävention der Tuberkulose

PROJEKTLEITER | Prof. Dr. Mahavir Singh | Abteilung für Genregulation und Differenzierung | msi@helmholtz-hzi.de

PROJEKTMITARBEITER | Cyril Alozieuwa | Dr. Sabin Bhuju | Ayssar Elamin | Dr. Matthias Stehr | Hanaa Wanas

Das Ziel des Projektes ist die Entwicklung neuer Diagnostika, Therapeutika und Impfstoffe gegen Tuberkulose und HIV. Für die Diagnose und die Entwicklung eines Impfstoffes sollen neue, hochspezifische Antigene identifiziert werden. Die Suche nach Leitstrukturen erfolgt durch das Durchmustern von Substanzbibliotheken gegen Virulenz-assoziierte Proteine und Enzyme der Erreger.

Die Tuberkulose ist eine bakterielle Infektionskrankheit, mit der sich jährlich etwa neun Millionen Menschen infizieren und an der zwei Millionen Menschen sterben. Von der Tuberkulose sind vor allem Afrika und Asien betroffen. In Deutschland ist die Zahl der Tuberkulose-Neuerkrankungen sogar rückläufig. Jedoch sind vor etwa 15 Jahren neue, mehrfachresistente Stämme aufgetaucht. Die sogenannten MDR- (Multi-drug-Resistant) und XDR- (Extrem Drug-Resistant) Stämme verbreiten sich rasant und sind schon weltweit zu finden. Da gegen die MDR- und vor allem die XDR-Stämme nur wenige der bekannten Antibiotika wirksam sind, müssen neue, hochwirksame Substanzen entwickelt werden, um die Rückkehr der Tuberkulose zu verhindern. Weiterhin werden viel schnellere Diagnostikmethoden als bisher benötigt, um die Ausbreitung der Krankheit zu verhindern.



Schematische Darstellung der AlaDH Struktur. Der gebundene Cofaktor NAD⁺ und Pyruvat sind als „Ball-and-Stick“ dargestellt.

Identifikation neuer Leitstrukturen für die Entwicklung neuer Antibiotika Im EU-geförderten Projekt NOPERSIST identifizieren wir neue Leitstrukturen, die gegen zwei Virulenz-assoziierte Enzyme des Erregers wirken. Die Alanin-Dehydrogenase (AlaDH) synthetisiert Bausteine für die Zellwandbiosynthese. Wir haben eine Methode entwickelt, mit der pro Woche etwa 10.000 Substanzen der HZI-Substanzbibliothek auf ihre Aktivität gegen das Enzym durchgemustert werden können. Bisher konnten wir 50 Hemmstoffkandidaten identifizieren, die zurzeit in Follow Up Assays weiter analysiert werden.

Weiterhin wird an einem Hochdurchsatzassay gegen die Thiol-Peroxidase, ein Enzym des mykobakteriellen Peroxid-Abwehrmechanismus, gearbeitet.

Neue Antigene für eine schnelle Diagnose und Impfstoffe

Für die Bekämpfung der Tuberkulose wird eine moderne und schnelle molekulare Diagnostik benötigt. Heutige Methoden dauern bis zu vier Wochen. Die Hochdurchsatz-Expression und Klonierung ermöglicht die Produktion hunderter mykobakterieller Proteine pro Woche. Die zelluläre und humorale Immunantwort auf diese Kandidatenproteine wird von den Partnern des NOPERSIST-Konsortiums analysiert, und die Impfstoff- sowie Diagnostik-Kandidaten werden identifiziert.

Transvac Weitere Probleme der Tuberkuloseforschung und Impfstoffentwicklung für armutsbedingte Krankheiten (PRD) werden im Rahmen von Transvac bearbeitet. Transvac ist die europäische Plattform für Impfstoffentwicklung für HIV, TB und Malaria.

Rosenkrands, I., Aagaard, C., Weldingh, K., Brock, I., Dziegiel, M.H., Singh, M., Hoff, S., Ravn, P., & Andersen, P. (2008) Identification of Rv0222 from RD4 as a novel serodiagnostic target for tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* **88**, 335-343.

Ågren, D., Stehr, M., Berthold, C.L., Kapoor, S., Oehlmann, W., Singh, M., & Schneider, G. (2008) Three-dimensional structures of apo- and holo-L-alanine dehydrogenase from *Mycobacterium tuberculosis* reveal conformational changes upon coenzyme binding. *Journal of Molecular Biology* **377**, 1161-1173.

Elamin, A.A., Stehr, M., Oehlmann, W., & Singh, M. (2009) The mycolyltransferase 85A, a putative drug target of *Mycobacterium tuberculosis*: Development of a novel assay and quantification of glycolipid-status of the mycobacterial cell wall. *Journal of Microbiological Methods* **24**, 358-363.

Von Groll A., Martin A., Stehr M., Singh M., Portaels F., da Silva P.E., & Palomino J. C. (2010) Fitness of *Mycobacterium tuberculosis* strains of the W-Beijing and Non-W-Beijing genotype. *PLoS One* **5**, e10191.



06 Mikrobielle Proteomforschung

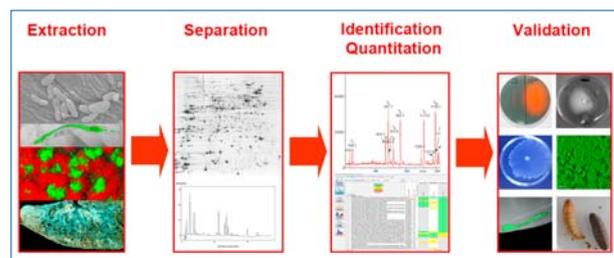
PROJEKTLEITER | Prof. Dr. Katharina Riedel | Arbeitsgruppe Mikrobielle Proteomik |
katharina.riedel@helmholtz-hzi.de | ak.riedel@tu-bs.de

PROJEKTMITARBEITER | Dr. Isabel Hartmann | Dr. Martin Kucklick | Thomas Langer | Christian Lassek

Proteomik – ein ideales Werkzeug zur Erforschung pathogener Mikroorganismen Proteine vermitteln und regulieren als eigentliche „Akteure des Lebens“ grundlegende zelluläre Funktionen. Zudem sind sie häufig auch direkte Angriffspunkte antimikrobieller Wirkstoffe. Die Charakterisierung sämtlicher exprimierten Proteine eines Mikroorganismus („Mikrobielle Proteomik“) ist daher ideal geeignet, um beispielsweise die molekulare Grundlage bakterieller Infektionen oder die Anpassung von Mikroorganismen an Antibiotika zu untersuchen. Wir verwenden 2D-Gelelektrophorese und modernste Gel-freie Techniken zur qualitativen und quantitativen Analyse mikrobieller Proteome.

Evaluierung neuer Antiinfektiva Durch das vermehrte Auftreten multiresistenter Mikroorganismen steigt der Bedarf an neuen antiinfektiven Wirkstoffen. Bakterielle Zell-Zell-Kommunikation (Quorum Sensing, QS) ist in vielen Pathogenen eine zentrale „Schaltstelle“ für die Expression von Virulenzfaktoren und die Ausbildung von Biofilmen. Damit ist sie ein attraktiver Ansatz für die Entwicklung alternativer Wirkstoffe. Ein Vorteil dieser Strategie ist das Ausbleiben von Resistenzen. Wir haben spezifische Sensoren entwickelt, um Substanz-Bibliotheken nach Wirkstoffen zu durchsuchen, die mit QS zweier wichtiger Pathogene, *Pseudomonas aeruginosa* und *Burkholderia cenocepacia*, interferieren. Effizienz und Spezifität der Substanzen untersuchen wir mit vergleichender Proteom-Analyse. Darüber hinaus haben wir in Zusammenarbeit mit Prof. J. Robinson (Universität Zürich) die Wirkweise sogenannter „Peptidomimetika“, die spezifisch *P. aeruginosa* inhibieren, entschlüsselt.

In situ Proteomik zur Erforschung der molekularen Grundlagen bakterieller Infektionen 80 Prozent aller mikrobiellen Infektionen im menschlichen Körper sind mit der Ausbildung von Biofilmen verknüpft. Da sie sehr resistent gegenüber traditionellen antimikrobiellen Wirkstoffen sind, ist die Entschlüsselung grundsätzlicher Prinzipien der Biofilm-Entwicklung ein wesentlicher Schritt für das Verständnis pathogener Bakterien. Wir haben *in situ* Proteom-Analysen von *P. aeruginosa* in zwei verschiedenen Pathogenitätsmodellen etabliert. Mit ihnen identifizieren wir mikrobielle Virulenzfaktoren, die spezifisch während des Infektionsprozesses exprimiert werden. Und wir analysieren Veränderungen im Wirtsproteom, die durch die Bakterien hervorgerufen werden. Langfristig soll damit in einer Kooperation mit Prof. M. Givskov (Universität Kopenhagen) die Wirkweise von „linked multi-drugs“ validiert werden, die mehr als eine Zielstruktur innerhalb der Bakterienzelle angreifen.



Ablauf einer typischen Proteom-Analyse beginnend mit der Proteinextraktion, gefolgt von Auftrennung und Analyse mittels Gel-basierenden oder Gel-freien Ansätzen kombiniert mit Massenspektrometrie und der abschließenden Daten-Validierung z.B. durch phänotypische Tests.

Metaproteom-Analysen gemischter Biofilme auf Blasen-kathetern Harnwegsinfektionen gehören zu den häufigsten nosokomialen Infektionen. Da uropathogene Bakterien sehr schnell Resistenzen ausbilden, sind Biofilme auf Blasen-kathetern schwer zu bekämpfen und treten häufig persistent oder chronisch auf. Jüngste Untersuchungen haben gezeigt, dass Katheter-Biofilme hochkomplex sind und aus vielen verschiedenen Spezies bestehen. Unsere Arbeitsgruppe ist Teil des UroGenOmics-Konsortiums, das regulatorische und metabolische Strategien während der Katheter-Kolonisierung und Infektion untersucht. Derzeit analysieren wir Zusammensetzung und Funktionen gemischter Biofilme mit Metaproteom-Analysen; uns interessieren besonders zeitliche und räumliche Veränderungen, sowie stamm-spezifische Strategien zur Anpassung an spezielle Bedingungen im Harntrakt. Unsere Ergebnisse sollen dazu beitragen, alternative Angriffspunkte für Pharmaka zu identifizieren, neue diagnostische Werkzeuge zu entwickeln und Katheteroberflächen zu entwerfen, die Biofilmen entgegenwirken.

Srinivas, N., Jetter, P., Ueberbacher, B.J., Werneburg, M., Zerbe, K., Steinmann, J., Van der Meijden, B., Bernardini, F., Lederer, A., Dias, R.L., Misson, P.E., Henze, H., Zumbunn, J., Gombert, F.O., Obrecht, D., Hunziker, P., Schauer, S., Ziegler, U., Käch, A., Eberl, L., Riedel, K., Demarco, S.J., Robinson, J.A. (2010). Peptidomimetic Antibiotics Target Outer-Membrane Biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Science* 327: 1010-1013.

Schneider, T., Riedel, K. (2010). Environmental proteomics: Analysis of structure and function of microbial communities. *Proteomics* 10: 785-798.

Riedel, K., Köthe, M., Kramer, B., Saeb, W., Gotschlich, A., Ammendola, A., Eberl, L. (2006). Computer-aided design of agents that inhibit the *cep* quorum sensing system of *Burkholderia cenocepacia*. *Antimicrob. Agents Chemotherapy* 50: 318-323.

POFII – UNABHÄNGIGE FORSCHUNG

Einige Projekte am HZI laufen außerhalb des PoF-Programms. In diesem Forschungsbericht werden 3 Projekte vorgestellt.

Ken Timmis, der in 2011 in den Ruhestand geht, stellt abschließende Ergebnisse aus seiner Arbeitsgruppe Umweltmikrobiologie zum Thema „Funktionelle Genomik und Nischen-Spezifität“ vor.

Inari Kursula koordiniert eine Arbeitsgruppe im neu gegründeten Zentrum für Strukturelle Systembiology (CSSB) am Deutschen Elektronen Synchrotron (DESY), Hamburg. Dies ist eine neue externe Arbeitsgruppe des HZI, nachdem ein gemeinsamer Kooperationsvertrag in 2010 unterzeichnet wurde. Irina Kursula präsentiert Ergebnisse zum Thema „Strukturbiologie des Zytoskeletts“.

Wolf-Dieter Schubert war bis 2009 Leiter einer Arbeitsgruppe am HZI bevor er nach Südafrika zurückkehrte. Er präsentiert hier Ergebnisse, die sich noch aus der Zusammenarbeit mit der Gruppe von Prof. Dr. Dirk Heinz ergeben haben und hier abschließend unter dem Titel „Strukturanalyse des angeborenen Immunsystems“ zusammengefasst werden.



Die Luftaufnahme zeigt das Deutsche Elektronen Synchrotron in Hamburg, wo Prof. Dr. Inari Kursula arbeitet. Foto: DESY



01 Funktionelle Genomik und Nischen-Spezifität

PROJEKTLEITER | Prof. Dr. Kenneth N. Timmis | Arbeitsgruppe Umweltmikrobiologie | kti@helmholtz-hzi.de

PROJEKTMITARBEITER | Dr. Sagrario Arias Rivas | Dr. Mónica Bassas Galia | Simrita Cheema | Dr. Thorben Dammeyer | Dr. Isabel Hartmann | Dr. Stefanie Libnow | Dr. Gabriella Molinari | Dr. Daniela Näther | Kateryna Selezska | Dr. Johannes Sikorski | Dr. Joao Vieira de Castro | Montri Yasawong.

Die Flora des menschlichen Gastrointestinaltraktes (GI) wurde als weiteres Organ des menschlichen Körpers und als Hauptabschnitt des menschlichen “Bioms” definiert. Damit lässt sich die Vielzahl unterschiedlichster Funktionen und Aufgaben zum Ausdruck bringen, die das Biom für den Organismus erfüllt. Und es würdigt den Umfang, in dem das Biom den menschlichen Phänotyp beeinflusst. Trotz der wichtigen Aufgaben bei der Wahrung des Gleichgewichts zwischen Gesundheit und Krankheit, ist und bleibt dieser Bereich vielgestaltig, veränderlich, schwer zu untersuchen und ist noch wenig erforscht. Aktuelle großangelegte Metagenom-Projekte dienen dazu, die Kenntnisse über die Zusammensetzung und die funktionale Genomik dieser mikrobiellen Ökosysteme zu erweitern. Dabei konzentrieren sich jedoch die Untersuchungen auf die zahlreichen Elemente, die am besten zugänglich sind und vermutlich die wichtigsten Funktionen haben.

Die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED), zu denen Morbus Crohn, *Colitis ulcerosa* und andere Formen der Kolitis zählen, sind komplexe, multifaktorielle Entzündungszustände. Von ihnen ist bekannt, dass sie durch verschiedene Genloci bestimmt werden, von denen man annimmt, dass sie durch die mikrobielle Darmflora ausgelöst bzw. manifest werden. Im Rahmen einer Kooperation mit der Universitätsklinik Kiel (Schreiber, Ott) und der Universität der Balearen (Nogales, Lanfranconi) haben wir für die Suche nach mikrobiellen Korrelationen mit Darmerkrankungen Schleimhautbiopsieproben aus den entzündeten Bereichen des Sigmoids von Patienten erhalten, die an verschiedenen Formen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen leiden. Daraus haben wir 16S-Ribosomal-RNA-Genklonbibliotheken erstellt, die Klone sequenziert und deren phylogenetische Zuordnungsparameter bestimmt. Obwohl die mikrobielle Besiedelung des Dickdarms größtenteils aus Bakterien besteht, gehören dort die methanogenen Archaeobakterien zu den kleineren Populationen. Daher haben wir zusätzlich zu den Bibliotheken der bakteriellen 16S-rRNA-Gensequenzen auch Bibliotheken der 16S rRNA-Gene der Archaeobakterien erstellt, die durch niedrig stringente Amplifikation unter Verwendung von Primern der Archaeodomäne gewonnen wurden. Überraschenderweise ergaben eine Reihe von Biopsien Sequenzen von Elementen der *Halobacteriaceae*, zusätzlich zu den erwarteten Sequenzen von Methanogenen. Dieses Ergebnis war einerseits unerwartet, weil der Gastrointestinaltrakt nicht als salziges Milieu gilt und es zuvor noch keine Hinweise auf eine Besiedelung dieses Traktes durch halophile Archaeobakterien gab – und andererseits wegen der außerordentlich

großen Vielfalt und der großen Anzahl neuartiger geklonter Sequenzen: 269 *Halobacteriaceae*-spezifische Sequenzen aus den Biopsien, die in 15 verschiedene Phylotypen untergliedert wurden (die nahezu die gesamte phylogenetische Breite dieser Familie abdeckten), wobei 9 davon neu waren.

Für die Koloskopien waren zunächst Darmspülungen mit einer Lösung aus Polyethylenglykol und Salzen erforderlich, so dass die haloarchealen Sequenzen möglicherweise von der Spüllösung stammen. Wir erhielten vom Krankenhaus zwei ungeöffnete Spüllösungspackungen, in denen die Biopsien aufbewahrt wurden und, zum Vergleich, eine Packung von demselben Hersteller über eine Apotheke in Palma, Mallorca, und eine andere von einem anderen Hersteller aus derselben Apotheke. Die DNA-Isolierung, die Amplifikation und die Sequenzierung der archivierten Klone wurden wiederholt. Desweiteren wurden 8 Stuhlproben von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen untersucht, bei denen die Darmspülung nicht durchgeführt worden war. Die *Halobacteriaceae*-ähnlichen Sequenzen fanden wir in 2 der 8 Stuhlproben (76 Sequenzen) sowie in allen Spüllösungsproben (125 Sequenzen), wobei letztere in 17 Phylotypen eingeteilt wurden und keiner davon mit den Phylotypen übereinstimmte, die in den Patientenproben gefunden wurden.

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass die halophilen Bakterien im menschlichen Darm von dem mit der Nahrung aufgenommenen Tafelsalz stammen könnten. Das zuvor erläuterte Verfahren wurde mit 3 Tafelsalzproben wiederholt, und wir erhielten 34 Sequenzen von Haloarchaeobakterien, die 11 Phylotypen repräsentierten. Keiner dieser Phylotypen stimmte mit denen aus den Spüllösungen überein, wobei nur einer der Phylotypen auch bei den Patienten vorkam.

Die verwendete experimentelle Methode ermöglicht keine Unterscheidung zwischen toten Zellen/freier DNA und überlebensfähigen, metabolisch aktiven Zellen. Deshalb wurden Anreicherungskulturen für halophile Bakterien angesetzt, die aus der Biopsie eines Patienten stammten. Als Ergebnis erhielten wir Sequenztypen von Haloarchaeobakterien, führten dann eine Hybridisierungsanalyse mit Hilfe der *in situ* Fluoreszenzmethode durch und erhielten nacheinander überlebensfähige Archaeobakterienzellen in diesen Kulturen. Fazit: Während die Haloarchaea über die Nahrung ständig in den Gastrointestinaltrakt gelangen, konnte aufgrund des fehlenden Zusammenhangs zwischen Tafelsalz und Magendarmtraktphylotypen nicht ermittelt werden, ob diese Phylotypen vom Tafelsalz oder von den Spüllösungen stammen.

Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass die Haloarchaeobakterien möglicherweise funktionelle Elemente der menschlichen Dickdarmflora sind, was einer intuitiven Vorgehensweise nicht zugänglich ist, da dieses Milieu nicht als ausgesprochen salzig gilt. Das Dickdarmmilieu ist eher heterogen: Während der Darminhalt von gesunden Personen einen durchschnittlichen Salzgehalt aufweist, der dem Salzgehalt des Plasmas nahe kommt (135–145 mM Natrium), können sich innerhalb der seitlichen Interzellularräume kleine Taschen von konzentrierten luminalen Ionen (die Angaben zufolge in Größenordnungen von 15 mM über dem der sie umgebenden Flüssigkeiten liegen) und Krypten als Teilprozess des normalen Flüssigkeitstransports im Darmepithel bilden. Bereiche wie die seitlichen Interzellularräume können somit geeignete Mikronischen bereitstellen, die für eine Besiedlung durch Haloarchaeobakterien günstig sind. Wenn die hierbei in den Kolonbiopsien vorgefundenen Haloarchaeobakterien tatsächlich aktiv sind, dann müssen deren Stoffwechsel und Abbaustoffe einen nicht unwesentlichen Einfluss auf die Physiologie der Schleimhaut im Allgemeinen und den erkrankten Darm im Besonderen und umgekehrt haben – wie es bereits für die Methanogene bei Kolorektalkrebs und Divertikulose postuliert wurde. In dieser Hinsicht ist es erwähnenswert, dass eine veränderte Darmphysiologie ein markantes Merkmal der chronisch entzündlichen Darmerkrankung ist. Die Beeinträchtigung der Absorption von Natrium und organischen gelösten Substanzen, wie kurzkettige Fettsäuren, z.B. Butyrat, führt zu erhöhten Konzentrationen an organischen gelösten Stoffen und zu einer Erhöhung der Osmolarität im Darminnenraum. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine Untersuchung der potenziellen physiologischen Basis des Zusammenhangs zwischen Haloarchaeobakterien und der Darmschleimhaut neue Erkenntnisse über den Gesundheits- bzw. Krankheitszustand des Gastrointestinaltraktes bringen wird.



02 Strukturbiologie des Zytoskeletts

PROJEKTLEITERIN | Prof. Dr. Inari Kursula | Zentrum für Strukturelle Systembiologie (CSSB) | iku09@helmholtz-hzi.de

PROJEKTMITARBEITER | Dr. Alexander Ignatev | Dr. Petri Kursula | Dr. Thorsten Mengesdorf | Saligram Prabhakar Bhargav | Moon Chatterjee | Gopinath Muruganandam | Nele Vervaeet

Wir sind daran interessiert, wie Proteine des Zytoskeletts einander erkennen und binden und wie die Polymerisation von Aktin in eukaryotischen Zellen geregelt ist. Insbesondere wollen wir verstehen, wie pathogene Parasiten ihr Aktinzytoskelett für Motilität und Invasion der Wirtszelle benutzen, und Wege finden, um diese Prozesse zu stören. Ein weiterer Schwerpunkt unserer Arbeit sind Histondeacetylasen, insbesondere solche mit zytosolischen Substraten. Wir verwenden Röntgenkristallographie und Kleinwinkelröntgenstreuung für Proteinstrukturbestimmung und ergänzende biophysikalische und biochemische Methoden zur funktionellen Charakterisierung von Proteinen und Komplexen. Wir arbeiten zudem an der Entwicklung neuer Synchrotronbasierter Methoden zur Visualisierung von großen Komplexen des Zytoskeletts bei hoher Auflösung.

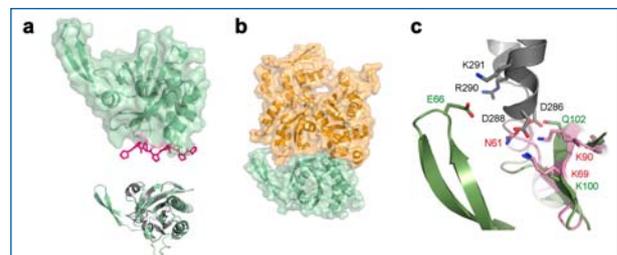
Aktin-basierte Motilität des Malariaparasiten Malaria ist eine der verheerendsten weltweiten Gesundheitsgefahren. Jedes Jahr sterben mehr als eine Million Menschen an Malaria. Bis zu 300 Millionen Menschen sind infiziert, die meisten von ihnen Kleinkinder und schwangere Frauen. Malaria ist auch eine bedeutende wirtschaftliche Belastung, durch die arme Gebiete in einer Abwärtsspirale von Armut gefangen sind. Resistenz gegen bestehende Anti-Malaria-medikamente ist ein wachsendes Problem in fast allen malariaendemischen Gebieten. Daher besteht ein dringender Bedarf an neuen Wirk- und Impfstoffen.

Malaria wird durch *Plasmodium spp.* verursacht, eine Gruppe von einzelligen, eukaryotischen, intrazellulären Parasiten. Sie gehören zum Stamm der *Apicomplexa*. Diese Parasiten nutzen Aktin für ihre Motilität und Invasion der Wirtszelle. Ihr Zytoskelett unterscheidet sich deutlich von dem der höheren Eukaryonten und ist deshalb ein attraktives Ziel für die Anti-Malariaforschung. Die Aktinfilamente der Parasiten sind extrem kurz, und ihr rascher Umsatz wird durch eine begrenzte Anzahl von Aktin-bindenden Proteinen geregelt, die gering mit ihren Säugetierhomologen konserviert sind.

Plasmodium Aktin-bindende Proteine mit unterschiedlichen Strukturen und Funktionen Profiline sind allgegenwärtige, kleine, Aktin-bindende Proteine. Sie vermitteln gemeinsam mit Forminen die Aktinpolymerisation durch Konzentration von polymerisierbaren Aktinmonomeren in der Nähe des wachsenden Filamentendes. Wir haben die Kristallstruktur von *P. falciparum* Profilin (*PfPfn*) bestimmt und gezeigt, dass es die Schlüsselfunktionen von Profilinen besitzt und für den Parasiten essenziell ist. Strukturell unterscheidet sich *PfPfn* deutlich von allen anderen Profilinen. Die großen strukturellen Veränderungen in der Nähe der Aktinbindungsstelle deuten auf einen möglicherweise neuen

Bindungsmodus an Aktin hin. Unsere Arbeit konzentriert sich darauf, die Regionen für die Interaktion zwischen *Plasmodium* Profilin und Aktin zu finden und die dreidimensionale Struktur des Komplexes zu bestimmen. Sobald uns die Kristallstruktur zur Verfügung steht, ist es möglich, Verbindungen zu suchen, die spezifisch den *Plasmodium* Profilin-Aktin-Komplex stören. Wir arbeiten auch an den beiden *Plasmodium* Forminisoformen, um herauszufinden, welche Rolle sie bei der Regulation der Aktinpolymerisation spielen und ob sie zusammen mit Profilin in diesen Parasiten wirken.

Plasmodium hat zwei Aktindepolymerisationfaktoren (ADFs), die sich voneinander in Struktur und Funktion unterscheiden. Die Hauptisoform in *Apicomplexa*, ADF1, ist essenziell, bindet kein F-Aktin und scheint eher als Nukleotid austauschfaktor anstatt als filamentdestabilisierendes Protein zu wirken. ADF2 ist nur in *Plasmodium spp.* anwesend und nicht essenziell, aber es ist den kanonischen Mitgliedern der ADF-Familie strukturell ähnlich.



a) Wir haben die Kristallstruktur von *Plasmodium falciparum* Profilin im Komplex mit einem Octaprolinpeptid bestimmt. Die Struktur enthält eine große β -Haarnadelinsertion, die in keinen anderen Profilinen vorhanden ist, wie in der Überlagerung von *Plasmodium* und Maus Profilinen (kleines Bild unten, grün *Plasmodium* und grau Maus Profilin) zu sehen ist.

b) Homologiemodellierung schlägt vor, dass die β -Haarnadelinsertion an Wechselwirkungen mit Aktin beteiligt sein könnte.

c) Eine Nahaufnahme der mutmaßlichen Wechselwirkungen der β -Haarnadelinsertion in *Plasmodium* Profilin (grün) mit Aktin (grau). Das überlagerte Maus Profilin ist in rosa dargestellt.

Grafiken: Inari and Petri Kursula

Kursula, P., Kursula, I., Massimi, M., Song, Y.H., Downer, J., Stanley, W.A., Witke, W. & Wilmanns, M. (2008) High-resolution structural analysis of mammalian profilin 2a complex formation with two physiological ligands: formin homology 1 domain of mDia1 and the proline rich domain of VASP. *Journal of Molecular Biology* 375, 270-290.

Kursula, I., Kursula, P., Ganter, M., Panjikar, S., Matuschewski, K. & Schüller, H. (2008) Structural basis for parasite-specific functions of the divergent profilin of *Plasmodium falciparum*. *Structure* 16, 1638-1648.

Huttu, J., Singh, B., Bhargav, S.P., Sattler, J., Schüller, H. & Kursula, I. (2010) Crystallization and preliminary structural characterization of the two actin depolymerization factors of the malaria parasite. *Acta Crystallographica Section F* 66, 583-587.

03 Strukturanalyse des angeborenen Immunsystems

PROJEKTLEITER | Prof. Dr. Wolf-Dieter Schubert | ehemalige Arbeitsgruppe Molekulare Wirt-Pathogen-Interaktionen | jetzt: Department of Biotechnology, University of the Western Cape, Cape Town, South Africa | wschubert@uwc.ac.za

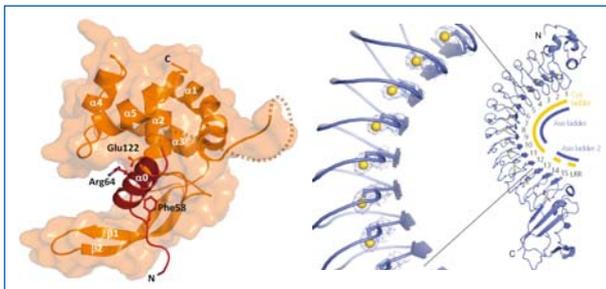
PROJEKTMITARBEITER | Nils Kuklik | Clive Mketsu | Mujaahida Mohammed | Edukondalu Mullapudi | Lilia Polle | Donné Simpson | Jason Stark

In der Arbeitsgruppe „Molekulare Wirt-Pathogen Interaktionen“ (MHPI) befassten wir uns mit den molekularen Details menschlicher Abwehrmechanismen gegen eindringende Pathogene (angeborene Immunität) und den molekularen Strategien der pathogenen Mikroorganismen, die Menschen infizieren.

Die Virulenzfaktoren InIj und Auto aus *Listeria monocytogenes* Das Bakterium *L. monocytogenes* kann Menschen nach dem Verzehr kontaminierter Lebensmittel infizieren. Für die Überwindung der Darmschranke, wie auch für alle folgenden Schritte des Infektionszyklus, besitzt *L. monocytogenes* hochspezifische Proteine, die es präzise koordiniert produziert und sezerniert. Um die Funktionsweise einiger für die Infektion wichtigen Faktoren auf submolekularer Ebene zu erläutern, haben wir den Zusammenhang zwischen Raumstruktur und physiologischer Funktion untersucht.

„Auto“ Die bakterielle Zellwand der grampositiven Bakterien ist eine komplexe äußere Hülle, die Zellen ihre Form verleiht und dem Innendruck des Zytoplasmas entgegenwirkt. Sie besteht aus langen, unverzweigten Ketten alternierender Zuckerreste (N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure), die durch kurze Peptide quervernetzt werden. Zellwachstum, Zellteilung und zahlreiche weitere Prozesse erfordern jedoch einen ständigen Umbau der Zellwand. An diesem Prozess beteiligte Enzyme werden als Autolysine bezeichnet.

Untersuchungen ergaben, dass lediglich ein Autolysin an der Pathogenese von *Listeria monocytogenes* beteiligt ist. Dieses Autolysin, als „Auto“ bekannt, wird für die Invasion in zahlreiche eukaryotischen Zelllinien benötigt.



Links: Kristallstruktur des Autolysins Auto aus *L. monocytogenes* als Schleifenmodell mit transparenter Oberfläche. Das aktive Zentrum des Pro-Enzyms wird durch eine N-terminale α -Helix (rot) blockiert. **Rechts:** Kristallstruktur des InIj (rechts) mit hervorgehobener Cysteinleiter aus reduzierten Cysteinen im hydrophoben Kern (links, Schwefel - gelb). Grafiken: HZI

Auto ist eine N-Acetylglucosaminidase, die das Zuckerrückgrat der Zellwand spaltet, indem es die Verknüpfung zwischen Zuckereinheiten hydrolysiert. Die Raumstruktur von Auto zeigt, dass es die Grundstruktur der lytischen Transglycosylasen und einiger Lysozyme teilt, obgleich sie unabhängige chemische Reaktionen katalysieren. Durch den gezielten Austausch einzelner Aminosäuren konnten wir die Glutamate Glu122 und Glu156 als katalytisch aktive Aminosäuren identifizieren. Zudem wird das native Auto durch eine eigene N-terminale α -Helix inhibiert. Die spezifische N-terminale Spaltung von Auto durch eine noch unbekannte Protease als Folge eines (extrazellulären) Signals, würde daher eine rasche und koordinierte Aktivierung dieses Enzyms erlauben. Darüber hinaus besitzt Auto ein überaus saures pH-Optimum von 4, wobei es bei einem pH von 7 weitgehend inaktiv ist. Das legt nahe, dass Auto an der koordinierten Befreiung des Erregers aus dem angesäuerten Phago-lysosom beteiligt ist. Durch seine Aktivierung und die poröse Zellwand ermöglicht es die Freisetzung weiterer Virulenzfaktoren wie Listeriolysin. Deren Aktivität wiederum würde die phago-lysosomale Membran zerstören, wodurch der pH auf physiologische Werte ansteigt und Auto inaktiviert würde.

InIj Eine Untergruppe der listeriellen Virulenzfaktoren sind die Internaline. Wie der Name bereits impliziert, ist Internalin bzw. InIA für die erzwungene Aufnahme des Bakteriums in Epithelzellen des menschlichen Dünndarms ausschlaggebend. Erst kürzlich wurde InIj als weiteres Mitglied dieser Familie identifiziert. InIj vermittelt die Adhäsion des Bakteriums an die Wirtszelloberfläche. InIj unterscheidet sich von anderen Familienmitgliedern, durch die Verringerung seiner 16 LRR-Einheiten von 22 auf 21 Aminosäuren. Außerdem ist häufig eine die LRR-Einheit definierende hydrophobe Aminosäure durch ein Cystein ersetzt. Die Kristallstruktur dieses Proteins zeigt, dass diese Cysteine linear angeordnet eine Leiter ausbilden. Hier liegt eine Anomalie vor: ein extrazelluläres (oxidierendes Milieu) Protein enthält eine große Anzahl reduzierter Cysteinreste. Dies wiederum impliziert, dass die Cysteine eine deutliche Stabilisierung der Struktur bewirken müssen, die ein Entfalten und die Oxidation der Cysteine verhindert.

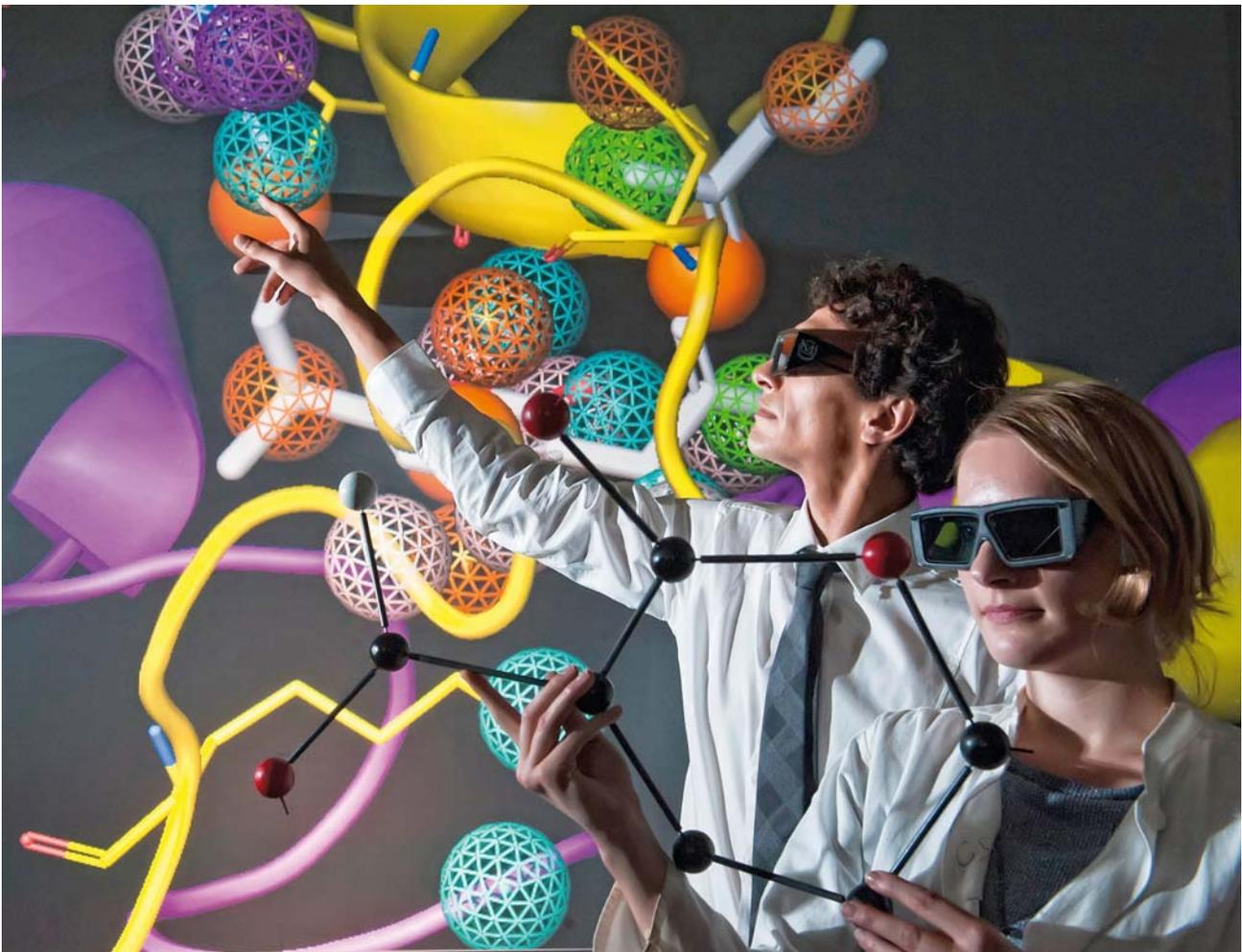
Brücker, M.J., Schomburg, S., Heinz, D.W., Jahn, D., Schubert, W.-D., & Moser, J. (2010) Crystal structure of the nitrogenase-like dark operative protochlorophyllide oxidoreductase catalytic complex (ChlN/ChlB)₂. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 27336-27345.

Heinemann, I.U., Schulz, C., Schubert, W.-D., Heinz, D.W., Wang, Y.G., Kobayashi, Y., Awa, Y., Wachi, M., Jahn, D., & Jahn, M. (2010) Structure of the heme biosynthetic *Pseudomonas aeruginosa* porphobilinogen synthase in complex with the antibiotic alaremycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **54**, 267-272.

Bublitz, M., Polle, L., Holland, C., Heinz, D.W., Nimtz, M., & Schubert, W.-D. (2009) Structural basis for autoinhibition and activation of Auto, a virulence-associated peptidoglycan hydrolase of *L. monocytogenes*. *Molecular Microbiology* **71**, 1509-1522.

TECHNOLOGIE-PLATTFORMEN

Für die wissenschaftlichen Projekte des Helmholtz-Zentrums für Infektionsforschung 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 des HZI mit anderen Helmholtz-Forschungszentren, Universitäten, außeruniversitären Forschungseinrichtungen und der Industrie. Die wichtigsten Plattformen sind im Folgenden näher beschrieben.



Dr. Matthias Negri und Jennifer Hermann, HIPS, diskutieren Wirkstoff-Zielmolekül-Interaktionen anhand von Modellen Foto: HIPS/HZI

01 Tierexperimentelle Einheit

LEITER | Dr. Hermann Riedesel | Arbeitsgruppe Tierexperimentelle Einheit | hri07@helmholtz-hzi.de

Die zentrale Aufgabe der Arbeitsgruppe ist die Zucht und Haltung von Labormäusen sowie die Bereitstellung von versuchstierkundlichen Serviceleistungen für die Wissenschaftler des HZI. Wir arbeiten nach neusten wissenschaftlichen Erkenntnissen unter strenger Beachtung aller geltenden Tierschutzbestimmungen. Die Tierhaltung besteht aus 24 Tier- und 13 Versuchsräumen und hat eine Gesamtkapazität von 15.000 Käfigen, was 37.500 Mäusen entspricht. Wir halten Labormäuse als einzige Spezies. Sie werden in einzeln belüfteten Käfigen in sieben Haltungseinheiten mit fünf verschiedenen Hygieneniveaus und drei unterschiedlichen Biosicherheitsstufen gehalten. Fünf Haltungseinheiten sind als komplette spezifiziert-pathogenfreie (SPF)-Barrieren konzipiert, zwei Einheiten sind als S2 Laboratorien und eine als S3 Laboratorium zur Durchführung von Infektionsversuchen registriert. Der durchschnittliche Tierbestand liegt bei 15.000 Mäusen, die sich auf etwa 450 verschiedene Stämme bzw. gentechnisch veränderte Mauslinien verteilen. Der vierteljährlich untersuchte Gesundheitsstatus entspricht den FELASA-Empfehlungen.

Die Tierexperimentelle Einheit bietet folgende Serviceangebote:

- Grundversorgung der Mäuse
- Zuchtbetreuung und Kolonienmanagement
- Mithilfe bei der Durchführung von Versuchen
- Gesundheitsüberwachung
- Tierbestellungen
- Organisation von nationalen und internationalen Tiertransporten
- Tierpflegerausbildung Fachrichtung Forschung und Klinik
- Tierschutzservice für 60 Versuchsvorhaben
- Versuchstierkundliche Beratung und Weiterbildung
- Quarantäne und Sanierung von 50 importierten Mauslinien
- *In vitro*-Fertilisation (IVF) zur Rettung, schnellen Vermehrung und Sanierung von Mauslinien
- Embryo-Kryokonservierung von Mauslinien und Betreiben einer Embryonenbank für Mäuse
- Herstellung von knock-out Mauslinien

2010 wurde das neue Tierhaus T2 in Betrieb genommen. Von Mai bis Juli wurden alle Zuchttiere in die neue Hochhygiene Zucht-Einheit in T2 verlegt. Im Oktober wurde die neue S2-Infektionseinheit gestartet. Die S3 Einheit soll in 2011 in Betrieb gehen. Nach Auszug aller Zuchttiere wurde das T1 Gebäude renoviert und für seine zukünftige Nutzung als experimentelle Haltungseinheit neu organisiert. Ein Stockwerk steht damit für S2-Vorab-Experimente mit Tieren externer Kooperationspartner zur Verfügung. Hier befindet sich eine „Imaging Unit“, die mit einem IVIS-System ausgestattet ist.

Im Jahr 2010 wurden in der Transgeneinheit 30 neue knock-out Linien hergestellt. 50 Mauslinien von vier neuen Arbeitsgruppen wurden erfolgreich über IVF bzw. Embryotransfer in unsere Zuchteinheit importiert. Die 2-Stufen Einfrieremethode mit Propandiol wurde erfolgreich implementiert. Diese funktioniert nun auch erfolgreich mit Embryonen, die durch IVF gewonnen werden.

Tierhaus am TWINCORE Die umgebaute Tierhaltung des TWINCORE in Hannover wurde im Sommer fertig gestellt und im September 2010 in Betrieb genommen. Diese Anlage besteht aus vier Tierräumen mit einer Fläche von 96,5 m², einer Käfigkapazität von 2300 IVC Käfigen und erlaubt die Durchführung von S1-, S2- und S3-Arbeiten. Die Kernzuchten aller TWINCORE-Linien werden am HZI geführt, so dass das TWINCORE-Tierhaus überwiegend für Vermehrungszuchten und experimentelle Haltung genutzt werden kann. Dadurch weisen alle Mäuse, die am TWINCORE gehalten werden, den gleichen Hygienestatus wie am HZI auf. In der TWINCORE-Tierhaltung arbeiten vier Tierpfleger und bieten die Dienstleistungen der Grundversorgung, der Zuchtbetreuung und der Assistenz bei Tierexperimenten an. Alle anderen oben aufgeführten Dienstleistungen werden durch die HZI-Tierhaltung angeboten.



Das Maushaus Foto: HZI, Krämer



02 Rekombinante Proteinexpression

LEITER | Dr. Joop van den Heuvel | Arbeitsgruppe Rekombinante Proteinexpression | jvh@helmholtz-hzi.de

WISSENSCHAFTLICHE MITARBEITER | Dr. Konrad Büssow | Dr. Volker Jäger | Prof. Dr. Ursula Rinas

Die als Arbeitsgruppe organisierte Plattform rekombinante Proteinexpression (RPEX) ist essentiell für die Produktion ultrareiner Proteine für die hochauflösende Strukturanalyse. In der AG RPEX sind die vier wichtigsten Expressionssysteme etabliert: *E. coli*, *P. pastoris*, das Baculovirus-Expressionssystem in Kombination mit Insektenzellen sowie verschiedene Säugerzellkulturen.

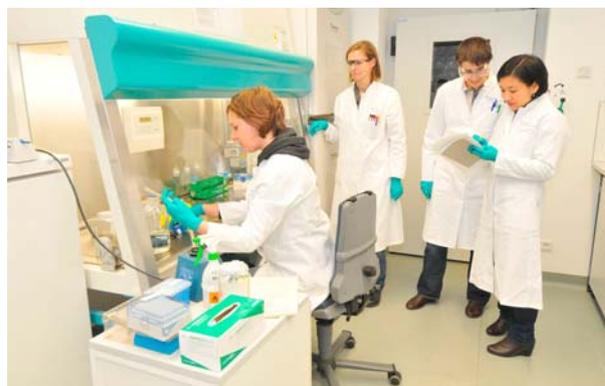
Die „Facility“ Die Proteinproduktion umfasst eine neue Zellkulturanlage für die Herstellung von Proteinen aus Insekten- und Säugerzellkulturen und eine mikrobiologische Proteinexpressionsanlage. Die Anlagen mit mehreren Kultivierungsstationen können variabel mit Zellkulturreaktoren von 1,6 bis 6 Liter Arbeitsvolumen bzw. 2 bis 5 Liter Bioreaktoren für *Pichia pastoris* und *E. coli* betrieben werden. Zur Reinigung endogener, niedrig exprimierter, (rekombinanter) Multiproteinkomplexe wurde zusätzlich ein 30-Liter-Bioreaktor in Betrieb genommen. Er ermöglicht die Herstellung von Proteinen im Pilotmaßstab.

Die Downstream-Pilotanlagen erlauben die Konzentrierung, Diafiltration und Reinigung von Proteinen aus großen Volumina bei Flussraten von 25-400 ml/min. Die Anlage wird eingesetzt um 5-100 mg verschiedener sekretierter Proteine, wie den humanen Wachstumsfaktor HGF, Varianten des cMET Rezeptors, den TLR2 Rezeptor sowie lysosomale Rezeptorproteine (LAMP) zu reinigen. Außerdem wurden größere Mengen natürlich vorkommender humaner Proteinkomplexe der humanen Zelllinie HeLa hergestellt.

Technologietransfer und Support In Zusammenarbeit mit dem Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin (MDC) entstand ein Verbund zur Produktion und Reinigung von Proteinproben (PSPF, Protein Sample Production Facility). Dieses Gemeinschaftsprojekt der HGF unterstützt die Strukturbioologen in Deutschland, indem es den wesentlichen Engpass, die Proteinherstellung, für die hochauflösende Strukturanalyse mit Röntgenkristallographie oder NMR-Spektroskopie beseitigt.

Supportanfragen können direkt auf der Homepage www.pspf.de gestellt werden. Die Kapazität der Anlage wird zurzeit zu 50% für HZI-interne Projekte genutzt. Darüber hinaus bietet die Plattform Schulungsmöglichkeiten zum Thema Proteinexpression in Insekten- und Säugerzellsystemen für externe Wissenschaftler an.

Infrastrukturen für die Strukturbioogie in Europa – Instruct 2010 wurde die HZI-PSPF in einer europaweiten Ausschreibung von der EU-Initiative „Instruct“ als Zentrum für die Produktion von Säugerproteinen ausgewählt.



PSPF-Trainingskurs zur Proteinexpression in Insektenzellkulturen Foto: HZI, Bierstedt

In Kooperation mit Partnern aus Europa wird technischer und wissenschaftlicher Support in großen und einzigartigen technologischen Anlagen für die Unterstützung der strukturbioologischen Forschung angeboten. Dadurch wird es möglich, neue Methoden zur strukturbioologischen Untersuchung von humanen Proteinen wie glykosylierten Rezeptorproteinen, Membranproteinen und Multi-Proteinkomplexen schneller zu entwickeln und zu nutzen.

Forschung Der Schwerpunkt unserer Forschung liegt auf der Neuentwicklung und Implementierung von schnellen eukaryontischen Produktionssystemen, die speziell für die Anforderungen strukturbioologischer Fragestellungen geeignet sind. Mehrere Kooperationsprojekte zur Analyse von einzelnen Proteinen und der Multiproteinkomplexe cMET, tcHGF, TLR1, TLR2, TLR5, ABCB6, LAMP2, LAMP3, GILT und -Tubulin Small Complex, werden in unserer Gruppe bearbeitet.

Als Werkzeug für die schnelle transiente Expression von rekombinanten Proteinen wurde die transiente Transfektion in HEK293 EBNA1 Zellen einlizenziert, etabliert und weiter optimiert. Dieser transiente Produktionsprozess zeichnet sich dadurch aus, dass zwischen der Transfektion der Zellen und der Produktion der rekombinanten Proteine kein Medienwechsel notwendig ist. Durch spezielle Zufütterungsstrategien während der Produktionsphase war es möglich, sc-Antikörper-Fusionsproteine mit Ausbeuten von mehr als 350 mg L⁻¹ herzustellen.

03 Genexpressionsanalyse

LEITER | Dr. Robert Geffers | Arbeitsgruppe Genomanalytik | rog@helmholtz-hzi.de

Diese Plattform ist eine zentrale Servicestelle für Wissenschaftler am HZI sowie für externe Kooperationspartner. Wir bieten Mikroarraytechnologie für die transkriptionelle und genomische Analytik mit folgenden Applikationen an:

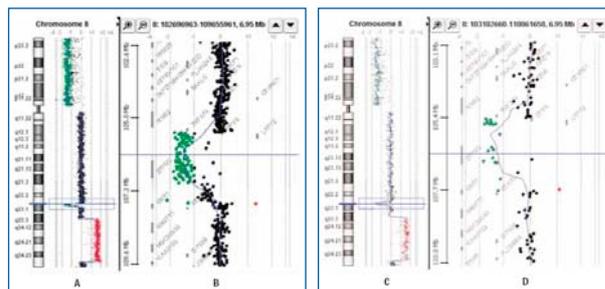
Genexpression Für die Genexpressionsanalyse bieten wir Mikroarrays der führenden Anbieter Affymetrix und Agilent Technologies an. Zudem stellen wir mit einem GeneArrayer eigene Arrayformate her. Zum überwiegenden Teil kommen sogenannte „whole genome“ Mikroarrays zum Einsatz. Mit rund 40.000 Sonden je Mikroarray wird das gesamte murine oder humane Transkriptom auf einem Array abgebildet. Moderne Agilent Mikroarrays erlauben bis zu acht separate Expressionsanalysen auf einem Chip. Das flexible Proben-design ermöglicht ohne größeren finanziellen Aufwand die Herstellung sämtlicher Organismen in der gewünschten Komplexität als Mikroarray. Dabei übernimmt die Plattform das Design und überwacht den Herstellungsprozess. Genexpressionsanalysen können auf unterschiedliche „Targets“ zurückgreifen. Häufig verwendet werden 3' Expressionsarrays. Hier werden die Sonden von einer im Transkript 3' gelegenen Sequenz abgeleitet. Solche Mikroarrays erlauben die Quantifizierung der Transkripte, ohne jedoch vorkommende Splice-Varianten zu erkennen. Auf Exon Arrays (Affymetrix) sind die Sonden entlang der Exone eines Gens berechnet, so dass eine quantitative wie auch qualitative Messung hinsichtlich der Splice-Varianten erfolgen kann. Auch hier übernehmen wir als Plattform auf Wunsch das experimentelle Design von Expressionsprojekten und unterstützen in der bioinformatischen Auswertung der Primärdaten.

microRNA Expression MicroRNAs spielen in der Genregulation eine bedeutsame Rolle. Eingebaut in den „RISC“-Komplex (RNA inducing Silencing Complex) vermitteln kleine RNA Moleküle den sequenz-abhängigen Abbau von mRNA bzw. drosseln die Translation der mRNA an den Ribosomen. Unsere Plattform bietet zu diesem Themenkomplex murine und humane microRNA- Expressionschips an, ständig aktualisiert auf die neuesten Releases der Sanger miRBase. Wir führen ebenfalls sowohl microRNA-Extraktion als auch die Arrayanalyse durch. Komplettiert wird unser Angebot durch eine systematische Auswertung der Ergebnisse im Hinblick auf veränderte microRNA-Expression und die damit einhergehende regulative Wirkung auf das Transkriptom.

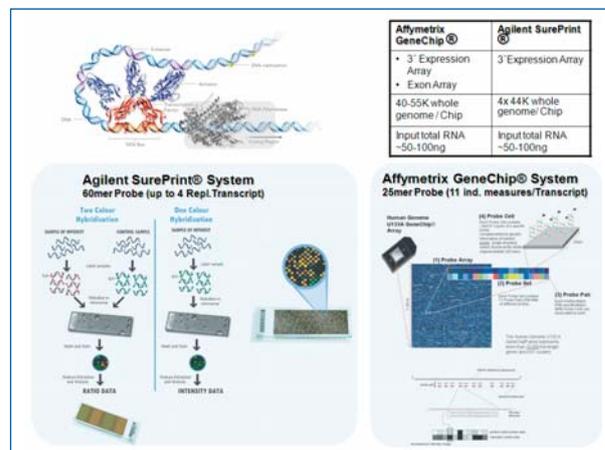
Tiling-Arrays Tiling-Arrays ermöglichen ein überlappendes Proben-design entlang bestimmter genomischer Zielsequenzen. Solche Zielsequenzen im Genom können regulative DNA-Abschnitte (Promotor, Enhancer) oder epigenetisch modifizierte Bereiche (CpG Inseln) sein. In einer vergleichenden Microarrayanalyse können zwei Fragen beantwortet werden: Zum Einen ermitteln wir in Promotorbindungsstudien inwieweit diese Zielsequenzen etwa durch Transkriptionsfaktoren erkannt werden. Zum Anderen lassen

sich so über den Methylierungsstatus unterschiedliche epigenetische Veränderung erkennen. Tiling-Arrays können sich aber auch über das gesamte Genom erstrecken (aCGH: Array-basierte, vergleichende Genomanalyse). Die vergleichende Analyse, bspw. eines Tumors gegen Normalgewebe, kann unter Verwendung dieser Arrays die genetische Instabilität einer Tumorentität bestimmen. Die Plattform bietet neben dafür ausgewiesenen Katalogformaten auch die Konzeption und Überwachung der Herstellung individueller Tiling-Arrays an. Damit steht je nach Komplexität der Applikation ein passendes Design zur Verfügung. Und wir unterstützen bei der Auswertung der Primärdaten.

Im Laufe zahlreicher interner und externer Kooperationen wurden Analysen zu unterschiedlichen Bereichen entwickelt: Tumorentwicklung und -typisierung, Pathogen-Wirt-Interaktionen bei Streptokokken, Pseudomonaden und Mykobakterien und Immunbiologie.



Agilent arrayCGH: Humane, Maus- und Ratten-Microarrays können für die Agilent SurePrint Systeme angeboten werden. Interessenten haben die Wahl zwischen den allgemeinen Katalog-Arrays oder für den Anwender zugeschnittene aCGH-Formate. Links: 244k aCGH, rechts: 105 aCGH Grafik: HZI



Genom-weite Expression: Humane, Maus- und Ratten-Arrays auf einem Affimetrix GeneChip oder auf Agilent SuerPrint Systemen Grafik: HZI



04 Peptidsynthese

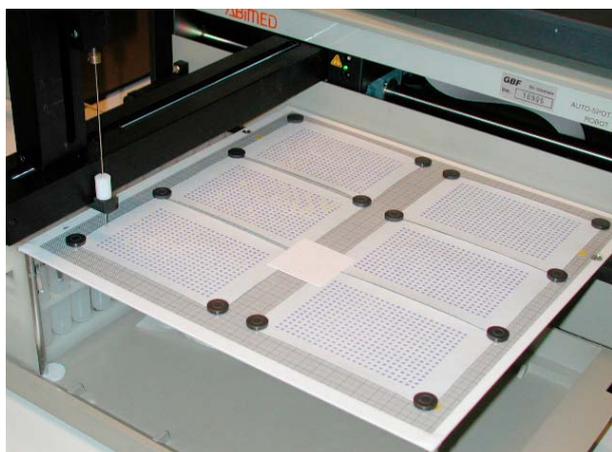
LEITER | Dr. Dr. Werner Tegge | Abteilung für Chemische Biologie | wte@helmholtz-hzi.de

WISSENSCHAFTLICHER MITARBEITER | Dr. Ronald Frank

Seit ihrer Einrichtung als Serviceeinheit im Jahr 1990 stellt die Plattform synthetische Peptide in löslicher Form her und immobilisiert sie in Form von Arrays für viele verschiedene HZI-Projekte und externe Kooperationen. Für die Synthese, Charakterisierung und Reinigung der Produkte werden moderne Spezialgeräte eingesetzt. Durch eigene Forschungsprojekte wird das methodische Repertoire kontinuierlich aktualisiert und erweitert.

In diesem Zusammenhang wurden u.a. entwickelt:

- neue Methoden für die Erzeugung von Peptid-Arrays (u.a. die SPOT-Methode)
- Methoden für die Herstellung von phosphorylierten und thiophosphorylierten Peptiden
- die Verwendung von neuen biokompatiblen Syntheseträgern
- neue, selektiv spaltbare Peptidlinker
- Verfahren für die Erzeugung von verzweigten Peptiden
- Methoden für die Erzeugung von Bibliotheken aus linearen und zyklischen Peptiden
- Methoden für die Verwendung von löslichen und immobilisierten Peptiden in biologischen Assays



Methodenentwicklungen für parallele Kombinatorische Chemie Synthese Screens beruhen auf der SPOT-Synthese, die auf Zellulosemembranen durchgeführt wird. Foto: HZI, Bierstedt

Lösliche Peptide Inzwischen wurden in der Plattform über 3.000 lösliche Peptide mit Längen von zwei bis über fünfzig Aminosäuren hergestellt. Lösliche Peptide werden standardmäßig durch HPLC und Massenspektrometrie charakterisiert. Falls erforderlich, werden weitere Untersuchungen durch Aminosäureanalyse, Proteinsequenzierung, spezielle massenspektrometrische Methoden und Kernresonanzspektroskopie im HZI-Bereich Strukturbiologie durchgeführt.

In Abhängigkeit von der geplanten Verwendung und der benötigten Qualität der Produkte werden Reinigungen durchgeführt. Dies geschieht in der Regel durch präparative HPLC. Für spezielle Anwendungen bietet die Plattform Peptidmodifikationen an, wie Fluoreszenz-Markierung, Phosphorylierung, Biotinylierung, Fettsäurekonjugation, PEGylierung, Verzweigungen und Zyklisierungen.

SPOT-Arrays In der Plattform werden immobilisierte Peptide in Form von Arrays für die empirische und systematische Suche nach Liganden hergestellt. Für das erfolgreiche Design solcher Arrays ist ein tiefgehendes Verständnis der biologischen Fragestellung essenziell. Dies wird durch einen intensiven Austausch und eine enge Zusammenarbeit mit den Nutzern gewährleistet. Die SPOT Arrays werden durch halb- und vollautomatische Verfahren auf Zellulosemembranen und anderen polymeren Trägern erzeugt. Pro Jahr werden ca. 15.000 Peptide und Peptidgemische mit diesen Methoden hergestellt und beispielsweise für Untersuchen von Protein-Protein Interaktionen – einschließlich immunologischer Epitopkartierung und Enzym-Substrat Affinitäten – eingesetzt.

Tegge, W., Bonafe, C.E.S., Teichmann, A., & Erck, C. (2010) Synthesis of peptides from α - and β -tubulin containing glutamic acid side chain linked oligo-Glu with defined length. *International Journal of Peptides*, Article ID 189396.

Nickl, C.K., Raidas, S.K., Zhao, Sausbier, M., Ruth, P., Tegge, W. Brayden, J.E. & Dostmann, W.R. (2010) (D)-Amino acid analogues of DT-2 as highly selective and superior inhibitors of cGMP-dependent protein kinase I-alpha. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **1804**, 524-532.

WeiB, S.M., Ladwein, M., Schmidt, D., Ehinger, J., Lommel, S., Stading, K., Beutling, U., Disanza, A., Frank, R., Jansch, L., Scita, G., Gunzer, F., Rottner, K. & Stradal, T.E.B. (2009) IRSp53 links Tir to EspF_{IV}/N-WASP-mediated actin assembly in EHEC pedestal formation. *Cell Host Microbe* **15**, 244-258.



05 Histologie-/Pathologie-Plattform

LEITER | Prof. Dr. Klaus Schughart | Abteilung für Infektionsgenetik | kls@helmholtz-hzi.de

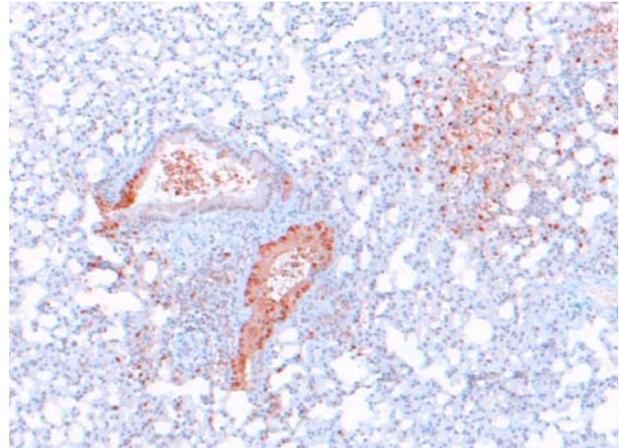
WISSENSCHAFTLICHE MITARBEITERIN | Dr. Verena Haist | Tierärztliche Hochschule, Hannover

Die Histologie-/Pathologie-Plattform wurde am HZI als zentrale Serviceeinheit eingerichtet. Sie ist Anlaufstelle für verschiedene Projekte und Forschungsgruppen, die histologische Arbeiten und pathologisches Fachwissen benötigen.

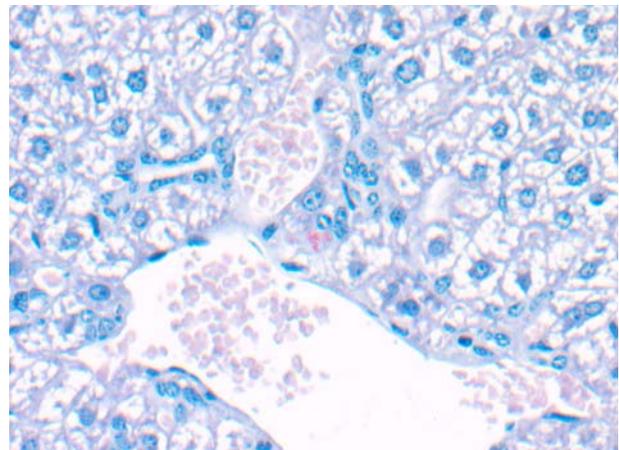
Viele Forschungsprojekte am HZI beschäftigen sich zurzeit mit der Durchführung von Infektionsexperimenten an Mäusen und mit der Untersuchung der Wirtsabwehr bei genetisch unterschiedlichen Mausstämmen und Mutantenslinien. Die Histologie-/Pathologie-Plattform bietet einen zentralen, maßgeschneiderten Service und die gesamte, erforderliche Infrastruktur aus einer Hand. Die Wissenschaftler des HZI können entweder den gesamten Service in Anspruch nehmen – von der Einbettung, dem Schneiden, dem Färben und der Archivierung der Gewebeproben bis hin zur Bewertung durch einen Pathologen – oder die vorhandene Infrastruktur nutzen und einige Arbeiten selbst ausführen.

Zurzeit werden Paraffinschnitte und histochemische Einfärbungen routinemäßig durchgeführt. Es stehen Kryostaten zur Verfügung, und es wird eine Reihe von immunhistochemischen Analysen angeboten, die es ermöglichen, die Immunzellen während der Infektion und Entzündung bei der Maus zu ermitteln. Kürzlich wurde ein Vibratom angeschafft, das Schnitte an lebendem Gewebe und damit die Herstellung von spezifischen Organkulturen für weiterführende Experimente erlaubt.

Die Einheit wird von Anna Rinkel betreut, und erfahrene Pathologen aus dem Institut für Pathologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover (Dr. Verena Haist) und dem Institut für Veterinärpathologie der Freien Universität Berlin (Prof. Dr. Achim Gruber) stellen ihr Fachwissen zur Verfügung und bieten Hilfe bei der Planung von Experimenten und der Auswertung der Ergebnisse.



Immunhistochemischer Nachweis des nukleären Proteins des Influenza A Virus (braune Färbung), welches infizierte Zellen in der Mauslunge zeigt. Foto: HZI



Ziehl-Neelsen Färbung eines Leberschnittes, in dem die Anwesenheit von säurefesten Bakterien (rote Färbung) nachgewiesen wurde. Foto: HZI



06 Instrumentelle Analytik

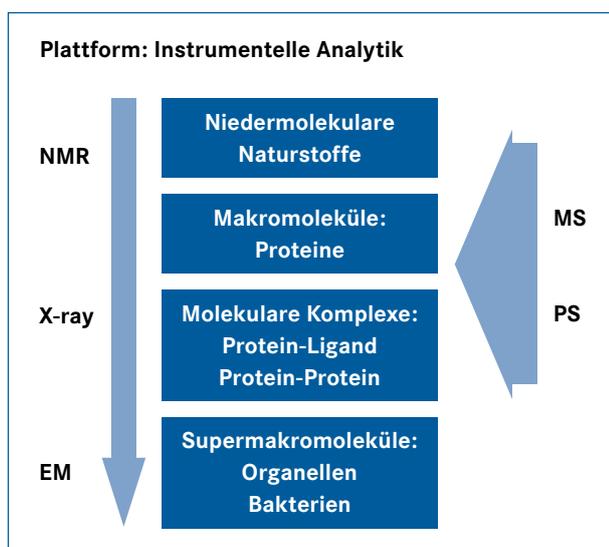
LEITER | Dr. Victor Wray | Arbeitsgruppe Biophysikalische Analytik | vwr@helmholtz-hzi.de

WISSENSCHAFTLICHE MITARBEITER | Dr. Heinrich Lünsdorf | Dr. Manfred Nimtz | Priv.-Doz. Dr. Manfred Rohde

Diese Plattform dient zur dreidimensionalen Strukturaufklärung aller Arten von Naturstoffen und setzt dazu das Instrumentarium der Massenspektrometrie (MS), Kernresonanzspektroskopie (NMR), Röntgenkristallographie (X-ray), Proteinsequenzierung (PS), Elektronenmikroskopie (EM) und konfokalen Laser-Mikroskopie ein.

Massenspektrometrie und Kernresonanzspektroskopie

Die Struktur der meisten niedermolekularen Naturstoffe lässt sich routinemäßig durch den Einsatz einer Kombination aus Massenspektrometrie (MS) und Kernresonanzspektroskopie (NMR) vollständig aufklären. Die direkte Analyse großer, intakter Biomoleküle wie Proteine, Oligonukleotide und komplexer Kohlenhydrate erfolgt routinemäßig mit MALDI- und ESI-MS. Ein großer Vorteil der Massenspektrometrie besteht darin, dass dieses Verfahren auch bei kleinsten Mengen komplexer Verbindungen detaillierte Informationen liefert. Bei der Identifizierung und Charakterisierung von Proteinen kommen automatisierte Mikrotechniken der Massenspektrometrie zum Einsatz. Es werden 2D-Gele und „gellose“ Techniken der „Proteomik“ angewendet. Die Identifizierung von Proteinen erfolgt durch Bestimmung des Molekulargewichts ihrer proteolytischen Teilpeptide und deren weitere Fragmentierung mit Hilfe von MALDI/TOF-MS/MS und HPLC-ESI-MS/MS. Die Sekundär- und Tertiärstruktur von Peptiden und Proteinen lässt sich mittels mehrdimensionaler NMR-Spektroskopie aufklären, wenn isotonenangereicherte Materialien (^{15}N und ^{13}C) zur Verfügung stehen.



Liste und Anwendungsschwerpunkte der Plattformtechniken zur Erforschung von Naturprodukten Grafik: HZI

Röntgenkristallographie Der Schwerpunkt der Röntgenkristallographie liegt auf der Strukturanalyse von Proteinen. Ein Pipettierroboter und ein Röntgengerät mit Flächendetektor und Drehanode stehen für Kristallisationsversuche und Datenerfassung zur Verfügung. Die Messung hochauflösender Daten und die Phasenbestimmung durch anomale Dispersion erfolgen unter Einsatz externer Synchrotronstrahlungseinrichtungen.

Elektronenmikroskopie Diese Technik ist mit einem Feldemissionsrasterelektronenmikroskop (FESEM) mit einem integrierten EDX-Analysesystem für Elementanalysen und einer Cryo-stage für Cryo-FESEM-Studien ausgestattet. Das Hauptaugenmerk liegt darauf, eine kompetitive Einheit mit modernem Methodenspektrum zur Verfügung zu stellen, um hochauflösende morphologische Analysen und Immunlokalisierungen von Proteinen vornehmen zu können. Hochauflösende FESEM-Techniken werden eingesetzt, um die Adhärenz und Invasion in Wirtszellen von verschiedenen pathogenen Bakterien zu untersuchen. Präparationsprotokolle wurden an die Wünsche der verschiedenen Forschungsgruppen auf dem Campus angepasst. Des Weiteren wurden FESEM-Methoden entwickelt, die eine Immunlokalisierung von Pathogenitätsfaktoren nicht nur auf der bakteriellen Zelloberfläche, sondern auch an den Berührungsflächen zwischen bakterieller und Wirtsmembran ermöglichen. Weiterhin wurde gezeigt, dass mit Protein-Pathogenitätsfaktoren ummantelte kolloidale Goldnanopartikel ein sehr nützliches Werkzeug darstellen, um den „cross-talk“ zwischen pathogenem Bakterium und der Wirtszelle zu studieren. Zusätzlich ist die Plattform mit einem konventionellen und einem energiefilternden Transmissionselektronenmikroskop (TEM, EF-TEM) ausgestattet. Sie werden einerseits dazu verwendet, um die FESEM-Studien vor allem in Hinsicht auf die Immunlokalisierung von Pathogenitätsfaktoren in der Bakterien- oder der Wirtszelle weiter zu ergänzen. Und wir untersuchen mit ihnen die intrazellulären Bewegungen („trafficking“) von Pathogenen. Andererseits wird TEM zur Beschreibung der quartären Struktur von Proteinen mit Hilfe der Negativkontrastierung eingesetzt. Ebenfalls werden hochaufgelöste Elementanalysen mit Hilfe von „Electron Spectroscopic Imaging“ und „Electron Energy Loss Spectroscopy“ durchgeführt.

Chen, H.-L., Lünsdorf, H., Hecht, H.-J., & Tsai, H. (2010) Porcine pulmonary angiotensin 1-converting enzyme - biochemical characterization and spatial arrangement of the N- and C-domains by three-dimensional electron microscopy reconstruction. *Micron* **41**, 674-685.

Dietrich, N., Rohde, M., Geffers, R., Kröger, A., Hauser, H., Weiss, S., & Gekara, N. (2010) Mast cells elicit proinflammatory but not type I interferon responses upon activation of TLRs by bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **107**, 8748-8753

Ibrahim, S. R. M., Min, C. C., Teuscher, F., Ebel, R., Kakoschke, C., Lin, W., Wray, V., Erada-Ebel, R., & Proksch, P. (2010) Callyaerins A-f and H, new cytotoxic cyclic peptides from the Indonesian marine sponge *Callyspongia aerizusa*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **18**, 4947-4956.

Zakikhany, K., Harrington, C.R., Nimtz, M., Hinton, J.C.D., & Römling, U. (2010) Unphosphorylated CsgD controls biofilm formation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Molecular Microbiology* **77**, 771-786.



Das Helmholtz-Institut für Pharmazeutische Forschung Saarland (HIPS)

Helmholtz-Institut für Pharmazeutische Forschung Saarland



GESCHÄFTSFÜHRENDER DIREKTOR | Prof. Dr. Rolf Müller | Helmholtz-Institut für Pharmazeutische Forschung Saarland (HIPS) im Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (HZI) | Campus Universität des Saarlandes, Gebäude C2₃, 66123 Saarbrücken | rom@helmholtz-hzi.de

MITARBEITER IN DER GESCHÄFTSFÜHRUNG | Dr. Markus Eheses | David Hofmann | Birgitta Lelarge | Natja Mellendorf | Claudia Thiele

Das Helmholtz-Institut für Pharmazeutische Forschung Saarland (HIPS) wurde im August 2009 gemeinsam vom Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (HZI) und der Universität des Saarlandes (UdS) gegründet. Das Ziel der Gründung ist die beschleunigte Identifizierung neuer Wirkstoffkandidaten für Antiinfektiva, deren Optimierung mit den Methoden der Molekularbiologie und der Medizinalchemie und Verbesserung des Transports an den Wirkort. Gerade das verstärkte Auftreten neuer und oft multiresistenter Pathogene erfordert eine effizientere Vorgehensweise bei der Entwicklung von Antiinfektiva. Die Gründung des HIPS als Außenstelle des HZI ist eine logische Konsequenz einer Initiative der Helmholtz-Gemeinschaft zur Intensivierung der Translationsforschung im Bereich der Gesundheitsforschung. Die Bündelung der international anerkannten, hohen Qualität der Infektionsforschung am HZI einerseits und der Pharmazie an der Universität des Saarlandes (UdS) andererseits generiert einen deutlichen Mehrwert. Kombiniert mit den Forschungsaktivitäten regionaler Partnerinstitute ist es nun an den Standorten Braunschweig und Saarbrücken gemeinsam möglich, in der Medikamentenentwicklung das gesamte Spektrum von der frühen Wirkstoffentwicklung bis zu klinischen Studien institutsintern abzudecken. Die Implementierung der gesamten Entwicklungspipeline wird den Einsatz von Naturstoffen in klinischen Studien erheblich beschleunigen.

Das Forschungsspektrum des HIPS umfasst gentechnische und genomanalytische Verfahren zur Optimierung von Naturstoffproduzenten und Leitstrukturen sowie zur medizinalchemischen Weiterentwicklung von Wirkstoffkandidaten. Zudem werden Methoden zum verbesserten Transport von Arzneistoffen über biologische Barrieren an ihren Wirkort erforscht und die Entwicklung optimaler Formulierungen vorangetrieben. Die drei Abteilungen des HIPS, „Mikrobielle Naturstoffe“ (MINS, Prof. R. Müller), „Wirkstoff-Design und -Optimierung“ (DDOP, Prof. R. W. Hartmann) sowie „Wirkstofftransport“ (DDEL, Prof. C.-M. Lehr), sind aus jeweils einer pharmazeutischen Arbeitsgruppe der UdS entstanden. In ihnen arbeiten insgesamt etwa 140 Personen, von denen Ende 2010 30 Mitarbeiter HIPS-seitig finanziert werden. Im Endausbau sollen etwa 100 Mitarbeiter in das neue HIPS-Gebäude einziehen, das in drei bis vier Jahren auf dem Campus der UdS fertig gestellt sein soll.

Die Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses ist eine weitere Aufgabe des HIPS. Im Aufbau befindet sich ein Programm zur strukturierten Doktorandenausbildung, das neben der Vermittlung von fachnahen Fertigkeiten und Schlüsselkompetenzen als Besonderheit einen optionalen einjährigen Auslandsaufenthalt beinhaltet. Weiterhin sollen drei Nachwuchsforschergruppen eingerichtet werden. Die Helmholtz-Nachwuchsgruppe „Metabolisches Engineering von Actinomyceten“ (AMEG) unter der Leitung von Dr. Andriy Luzhetskyy nimmt im Januar 2011 ihre Arbeit am HIPS auf. Durch Nachberufungen auf die vakant werdenden



Die Gründungsabteilungsleiter des HIPS: Claus-Michael Lehr (DDEL), Rolf Müller (MINS) und Rolf W. Hartmann (DDOP) Foto: HZI

Universitätsprofessuren und neu einzurichtenden Juniorprofessuren an der UdS wird die Anzahl der Gruppen mit pharmazeutischem Arbeitsschwerpunkt am Standort Saarbrücken somit von derzeit fünf Vollprofessuren und 2 Nachwuchsforschergruppen auf mittelfristig 14 Gruppen anwachsen. Die so entstehende pharmazeutische Kompetenz soll unter dem Dach des geplanten „Zentrums für Pharmazeutische Forschung Saarland“ zukünftig eng zusammenarbeiten, um Synergien der unterschiedlichen Forschungsansätze, Methoden und Gerätschaften zu nutzen.

Die enge Anbindung des HIPS an das HZI wird mit Hochdruck vorangebracht und erfolgt durch Forschungsk Kooperationen und Verzahnung der administrativen und infrastrukturellen Aktivitäten wie Controlling, Personalverwaltung,

Rechenzentrum sowie Öffentlichkeitsarbeit. Dem Direktor des Instituts stehen hierfür jeweils ein Verwaltungsleiter, ein wissenschaftlicher Referent und eine administrative Assistentin unterstützend zur Seite.

Die Abteilung „Mikrobielle Naturstoffe“ (MINS)

Abteilungsleiter | Prof. Dr. Rolf Müller | Helmholtz-Institut für Pharmazeutische Forschung Saarland (HIPS) im Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (HZI) | Abteilung für Mikrobielle Naturstoffe (MINS) | rom@helmholtz-hzi.de
Wissenschaftliche Mitarbeiter | Dr. Daniel Krug | Dr. Silke Wenzel

Den Schwerpunkt der Forschung in der Abteilung „Mikrobielle Naturstoffe“ bildet die Untersuchung der chemischen Eigenschaften, der biologischen Aktivität, der Produktion sowie der Regulation von Naturstoffen aus Myxobakterien. Diese im Boden lebenden Bakterien gehören ebenso wie die schon länger als Wirkstoffproduzenten bekannten Actinomyceten zu den wichtigsten Quellen von Naturstoffen. Sie können verschiedenste Aktivitäten aufweisen und zum Beispiel als Antibiotika, Krebstherapeutika, Immunsuppressiva oder Parasitenbekämpfungsmittel eingesetzt werden. Myxobakterien bilden eine Vielzahl von Naturstoffen, sogenannte Sekundärmetabolite, unter anderem um mikrobielle Konkurrenten oder Feinde auszuschalten. Die Erforschung des enormen Potenzials der Myxobakterien für die Herstellung biologisch aktiver Substanzen erfordert den Einsatz eines breiten Spektrums unterschiedlicher Methoden aus den Bereichen Mikrobiologie, Molekularbiologie, Genetik, Biochemie, Verfahrenstechnik und analytische Chemie.

Neu isolierte Myxobakterien aus diversen Lebensräumen weltweit bilden zusammen mit der historisch gewachsenen Myxobakterien-Stammsammlung des HZI in Braunschweig (über 8000 Stämme sind dort eingelagert) die Grundlage für die Suche nach bislang unbekanntem Naturstoffen. Dabei ist es bereits gelungen, neue Bakterienarten, -gattungen und -familien sowie zahlreiche Kandidaten für neue Naturstoffe



Sonja Burkart aus der Abteilung MINS kontrolliert eine Kultur im Schüttler. Foto: HZI, Bellhäuser



(A) Schwarm von *Bysovorax cruenta* verlässt ein Cellulosestück auf einer Agar-Platte und (B) lichtmikroskopische Aufnahme eines Fruchtkörpers von *Chondromyces crocatus*

Fotos: R. Garcia

zu identifizieren. Bei der Isolierung eines neuen Myxobakteriums ist es häufig unumgänglich, eine aufwendige Optimierung von mikrobiologischen Arbeitsweisen und Kultivierungsbedingungen zu betreiben, denn Myxobakterien pflegen einen ausgesprochen komplexen „Lebensstil“: Sie sind in der Lage sich in Schwärmen gleitend fortzubewegen und sich von anderen Mikroorganismen zu ernähren, indem sie diese regelrecht vertilgen. Unter Hungerbedingungen dagegen bilden Myxobakterien multizelluläre Strukturen, die sogenannten Fruchtkörper, in deren Inneren sie als Myxosporen auch Stress wie z.B. Hitze oder Trockenheit überdauern können.

Sobald es gelingt, ein Myxobakterium unter Laborbedingungen zu kultivieren, setzt die Abteilung MINS moderne massenspektrometrische Methoden ein, um das Metabolitenprofil auf die Anwesenheit bereits bekannter myxobakterieller Sekundärmetaboliten zu untersuchen. Gleichzeitig dient eine Reihe mikrobiologischer und zellbiologischer Aktivitätstest dazu, möglicherweise vorhandene neue Sekundärmetaboliten mit interessanter Wirkung zu entdecken. Deren Produktion wird sodann optimiert und nach Fermentation des Produzentenstamms im vergrößerten Maßstab mit flüssigkeitschromatographischen Verfahren aufgereinigt und der Strukturaufklärung zugeführt. Außerdem folgen häufig weitere zellbiologische Untersuchungen, um den Wirkmechanismus eines vielversprechenden neuen Naturstoffs im Detail aufzuklären. Diese Arbeiten werden in enger Kooperation mit der Arbeitsgruppe Mikrobielle Wirkstoffe (MWIS) am HZI durchgeführt.

Ebenso wichtig wie die Entdeckung neuer Myxobakterien und Naturstoffe ist MINS die Erforschung der Naturstoffbiosynthese einschließlich der Funktion der einzelnen daran beteiligten Enzyme. Die resultierenden Grundlagenkenntnisse werden dann genutzt, um über regulatorische Prozesse die Ausbeute zu optimieren und gezielt in die Biosynthesen einzugreifen, um neue und veränderte Strukturen herzustellen. Zu diesem Zweck sequenzieren die Forscher der Abteilung MINS die ungewöhnlich großen Genome einer Reihe von Myxobakterien, nachdem sie vor einigen Jahren das bislang größte entdeckte Bakteriengenom des Myxobakteriums *Sorangium cellulosum* vorgestellt haben. Es zeigt sich dabei regelmäßig, dass Myxobakterien eine außerordentlich große „genetische Kapazität“ zur Herstellung von Naturstoffen haben: jedes einzelne Myxobakterium ist in der Lage, neben den bereits bekannten Substanzen eine weitaus größere Anzahl bisher unbeschriebener Sekundärmetabolite zu produzieren. Die bioinformatisch entschlüsselten Genome der Mikroben bilden so die Grundlage dafür, mit hochempfindlichen analytischen Methoden, etwa massenspektrometrischen Metabolomics-basierten Ansätzen, nach bisher unbekanntem Naturstoffen zu suchen. Weiterhin nutzt MINS die genetischen Daten, um die Produktion der myxobakteriellen Metabolite in den Bakterien zu optimieren oder deren Synthese in geeigneten Fremdorganismen mit erhöhter Ausbeute zu veranlassen. Darüber hinaus ist es möglich, Wirkstoffe durch gezielte genetische Veränderungen zielgerichtet strukturell umzugestalten. Die Erkenntnisse aus der Analyse der myxobakteriellen Genome helfen nicht zuletzt auch dabei, die Mikrobiologie dieser Organismen besser zu verstehen.

Die Abteilung „Wirkstoff-Design und Optimierung“ (DDOP)

Abteilungsleiter | Prof. Dr. Rolf W. Hartmann | Helmholtz-Institut für Pharmazeutische Forschung Saarland (HIPS) im Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (HZI) | Abteilung für Wirkstoff-Design und Optimierung (DDOP) | rwh09@helmholtz-hzi.de

Wissenschaftliche Mitarbeiter | Dr. Johannes De Jong | Dr. Jörg Haupenthal | Dr. Matthias Negri | Dr. Anke Steinbach | Dr. Christina Zimmer

Aufgrund der stetig steigenden Anzahl an multiresistenten Pathogenen und deren weltweiter Ausbreitung – insbesondere in Krankenhäusern – stellt die Behandlung von Infektionskrankheiten mehr denn je ein zunehmendes Problem für das Gesundheitswesen dar. Die Entwicklung neuer, antibiotisch wirksamer Substanzen besitzt daher eine wachsende Aktualität und höchste Priorität für die Pharmazeutische Forschung. Herkömmliche Antibiotika greifen gezielt in lebensnotwendige Vorgänge in Bakterien ein, um so die Krankheitserreger abzutöten. Ein alternativer

Ansatz zielt darauf ab, durch Interferenz des Wirkstoffs mit dem Kommunikationssystem der Bakterien die Zell-Zell-Kommunikation der Bakterien zu unterbinden. Dieses Kommunikationssystem basiert auf dem Austausch von Signalmolekülen und reguliert unter anderem die Produktion von Virulenzfaktoren und die Biofilmbildung. Beide könnten somit über diesen Weg abgeschwächt oder gar unterbunden werden.

Die Fortschritte in der Erforschung von Mikroorganismen haben zu einer erhöhten Anzahl an Naturstoffen mit antibiotscher Wirkung geführt. In der Antibiotikaforschung werden allerdings oft Naturstoffe als besonders wirksam identifiziert, die nachteilige pharmakokinetische Eigenschaften aufweisen, wie beispielsweise eine geringe Löslichkeit oder eine schwierige Synthese in großem Maßstab. Die Abteilung DDOP beschäftigt sich mit der Entwicklung von neuartigen, synthetischen Antiinfektiva. Diese werden entweder von Naturstoffen abgeleitet und nachfolgend optimiert, oder sie werden einem rationalen Wirkstoffdesign folgend neu konzipiert. Verschiedene medizinisch-chemische Strategien werden hierfür angewandt, von der Vereinfachung der chemischen Komplexität der Substanzen bis hin zum Computer-gestützten Wirkstoffdesign.

In der Abteilung DDOP werden zwei Hauptprojekte bearbeitet, die entweder auf das Bakterienwachstum oder ihr Zell-Zell-Kommunikationssystem abzielen.

Entwicklung von potenten Hemmstoffen der bakteriellen RNA-Polymerase Dieses Projekt befasst sich mit der Aufgabe, einen neuartigen, potenten Hemmstoff herzustellen, der das Ablesen der genetischen Information in Bakterien verhindert. Der Angriffspunkt dieses Hemmstoffes ist die sogenannte RNA-Polymerase (RNAP), ein Enzym, das für das Überleben von Bakterien essenziell ist.



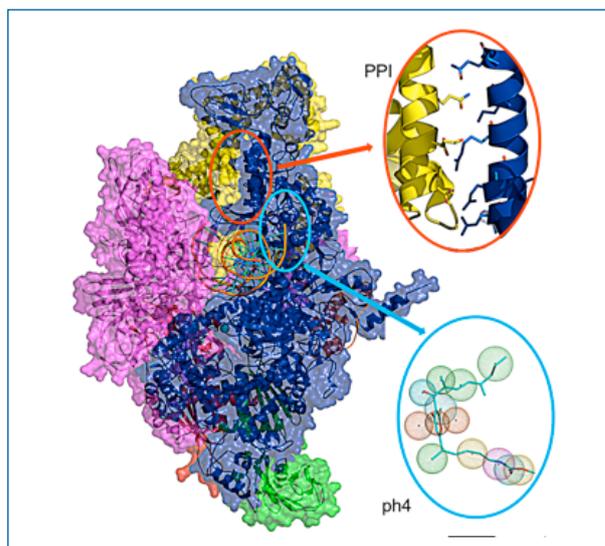
Jeannine Jung und Cenbin Lu aus der Abteilung DDOP diskutieren die Synthese eines neuen Inhibitors. Foto: HZI, Bellhäuser

RNAP ist das Enzym, das für die Bildung von RNA in Zellen verantwortlich ist. Es ist ein komplexes, sehr großes Enzym mit einer Masse von ca. 400 kDa, das aus verschiedenen Protein-Untereinheiten besteht. Dabei handelt es sich um das katalytisch aktive Core-Enzym ($\alpha 2\beta\beta'$) und den Sigma-Faktor. Diese beiden Proteine interagieren während der Transkription miteinander. Da RNAP essenziell für das Bakterienwachstum ist und dabei spezifisch zwischen Bakterien wirkt, ist es ein attraktives Ziel für die Entwicklung eines Breitbandantibiotikums beim Menschen. Die Hemmung der RNAP hat zur Folge, dass für das Bakterium lebenswichtige Funktionen blockiert werden, die letztendlich dessen Tod bewirken. Als Zielbakterien sind solche besonders interessant, die beim Menschen schwerwiegende Erkrankungen hervorrufen. Hierzu zählt insbesondere *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), der Erreger der Tuberkulose, der weltweit zwei Millionen Tote pro Jahr verursacht. Da viele Bakterien eine wirkungsvolle Resistenz gegen derzeit auf dem Markt erhältliche Antiinfektiva entwickeln, steigt der Bedarf an neuen Wirkstoffen kontinuierlich. Ziel dieses Projektes ist es, neuartige Hemmstoffe der bakteriellen RNAP zu entwickeln und deren Wirkmechanismus zu verstehen. Der Wirkstoff soll nicht nur hinsichtlich seiner Potenz optimiert werden, sondern dahingehend, dass er in pathogene Bakterien eindringen kann, um dort letztlich seine antibiotische Funktion zu entfalten.

Im Rahmen der Wirkstofffindung werden zweierlei Ansätze verfolgt:

Der erste Ansatz hat zum Ziel, das Core-Enzym direkt zu hemmen. Da die Struktur der RNAP und verschiedene Hemmmechanismen weitgehend bekannt sind, nutzt die Abteilung DDOP intelligente Computer-gestützte Methoden, um potenzielle Hemmstoffe virtuell ausfindig zu machen. Diese „virtuellen Hits“ werden in experimentellen Tests auf ihre Wirksamkeit überprüft. Hits, die dabei als aktiv hervorgehen, werden in einem chemischen Optimierungszyklus weitergeführt, aus dem potente RNAP-Hemmstoffe hervorgehen sollen. Auch dieser Zyklus wird von virtuellen Designkonzepten und abgeleiteten Strukturwirkungsbeziehungen unterstützt.

Der zweite Ansatz hat zum Ziel, die Interaktion zwischen Core-Enzym und Sigma-Faktor, und somit die Bildung des Holoenzym zu unterbinden. Deren Interaktionsfläche (das „Interface“) ist bereits eingehend untersucht und wurde durch verschiedene Mutagenesestudien charakterisiert. Diese Informationen werden in der Abteilung DDOP genutzt, um eine geeignete Region für die Bindung und folglich für eine Inhibition durch einen Hemmstoff ausfindig zu machen. Erste RNAP-Hemmstoffe wurden bereits identifiziert. Das Ziel besteht nun darin, diese Verbindungen, zum



Darstellung der Struktur der RNA Polymerase, die die fünf Untereinheiten hervorhebt. Ligand- und Struktur-basierte Ansätze werden im Design neuer RNAP Inhibitoren verfolgt.

Teil kurzketzige Peptide, hinsichtlich ihrer Hemmwirkung und verschiedener pharmakologischer Eigenschaften zu verbessern. Daraus soll letztlich ein Wirkstoff erhalten werden, der seine antibiotische Wirkung gezielt im Menschen entfalten kann.

RNAP aus *E. coli* und *Mycobacterium tuberculosis* soll kloniert und für biologische Tests der synthetisierten Verbindungen verwendet werden. Die vermuteten Bindungsstellen der neuen potenten Inhibitoren sollen dann durch Mutagenese charakterisiert werden.

Entwicklung von Verbindungen, die mit dem PQS *quorum sensing* Kommunikationssystem in *P. aeruginosa* interferieren

In diesem Projekt beschäftigen sich die Wissenschaftler der Abteilung DDOP mit der Entwicklung von Verbindungen, die mit dem PQS *quorum sensing* Kommunikationssystem in *Pseudomonas aeruginosa* interferieren. Lungeninfektionen durch dieses opportunistisch pathogene Bakterium werden als Haupttodesursache für Patienten mit Zystischer Fibrose angesehen. Resistenzen gegen herkömmliche Antibiotika sind oft assoziiert mit der Bildung von Biofilmen, die das Eindringen von eingesetzten Antibiotika durch diese physikalische Barriere verhindern und die Immunantwort herabsetzen. Sowohl die Bildung eines Biofilms als auch die Produktion von Virulenzfaktoren werden durch ein kompliziertes *quorum sensing* Kommunikationssystem gesteuert. Darüber nehmen Bakterien beispielsweise ihre Populationsdichte wahr und steuern eine Art Gruppenverhalten. Neben den zwei *quorum sensing*

Systemen LasR und RhIR, die in vielen Bakterienarten existieren, gibt es in *P. aeruginosa* ein drittes, einzigartiges Kommunikationssystem, das durch PQS (Pseudomonas Quinoline Signal, 2-Heptyl-3-Hydroxy-4-Chinolon) als Signalmolekül reguliert wird. Das Ziel des Projektes ist die Entwicklung von Verbindungen, die mit dem PQS *quorum sensing* Kommunikationssystem interferieren, um die Bildung eines Biofilms sowie die Produktion von verschiedenen Virulenzfaktoren zu verhindern – dieses jedoch, ohne das Wachstum der Bakterien zu beeinflussen. Zwei Ansätze werden verfolgt: einerseits soll die Wirkung von PQS am Rezeptor PqsR antagonisiert werden, andererseits soll die Biosynthese von HHQ, dem direkten Vorläufer von PQS, durch die Hemmung des Enzyms PqsD blockiert werden.

Entwicklung von Antagonisten des Transkriptionsregulators PqsR Ein Fokus liegt in der Synthese von Analoga von PQS, welche an PqsR binden und dieses blockieren sollen. Der Transkriptionsregulator PqsR steuert nach Aktivierung durch PQS die Expression von Virulenzfaktoren. Die PQS-Analoga werden in einem gerade etablierten β -Galaktosidase-Reporter-Gen-Assay getestet. Dabei wird die transkriptionale Aktivierung des PqsA-Promoters als Folge der PQS-Bindung an PqsR gemessen. Des Weiteren sollen SPR-Methoden zur kinetischen Charakterisierung von Hits mit dem verkürzten PqsR (^{C87}PqsR) entwickelt und für ein *medium-throughput screening* einer Fragmentbibliothek eingesetzt werden. Daraus resultierende Hits werden mittels ITC (Isothermische Titrationskalorimetrie) thermodynamisch charakterisiert.

Hemmung des zweiten Enzyms der PQS-Biosynthese PqsD Um potenzielle PqsD-Inhibitoren biochemisch zu evaluieren, wurde ein PqsD LC-MS/MS basierter Hemmungstest etabliert. Neue PqsD-Hemmstoffe, strukturelle Analoga des nativen Substrats Anthraniloyl-CoA, wurden bereits synthetisiert. In einem SPR-basierten *medium-throughput screening* werden aktuell eine hauseigene Substanzbibliothek sowie kommerzielle Fragment-Datenbanken getestet. Daraus resultierende Hits werden nachfolgend kinetisch charakterisiert. Begleitend zum SPR-Ansatz wird auch ein virtuelles Screening an PqsD durchgeführt. Erste bindende Fragmente wurden bereits identifiziert und werden in einem *fragment-growing*-Ansatz als neue Grundgerüste benutzt. Die Identifizierung von Fragmenten und ihren Bindungsmodi wird mit hoch-auflösender NMR-Spektroskopie begleitet. Weiterhin sollen kinetische Studien, die sowohl computergestützt, als auch biochemisch (biologische Assays, SPR, ITC) durchgeführt werden, die Entwicklung von PqsD-Hemmstoffen vorantreiben. Insbesondere die Überprüfung der kinetischen Mechanismen mittels Moleküldynamiksimulationen ermöglicht einen Einblick in die Flexibilität des Proteins und kann dazu beitragen mögliche *induced-fit* Mechanismen aufzudecken und zu erklären.

Die Abteilung „Wirkstofftransport“ (DDEL)

Abteilungsleiter | Prof. Dr. Claus-Michael Lehr | Helmholtz-Institut für Pharmazeutische Forschung Saarland (HIPS) im Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (HZI) | Abteilung für Wirkstofftransport (DDEL) / cle09@helmholtz-hzi.de
Wissenschaftliche Mitarbeiter | Dr. Eva-Maria Collnot | Dr. Nicole Daum | Dr. Steffi Hansen | Dr. Brigitta Loretz

Wirkstofftransport über biologische Barrieren hinweg

Fortschritte in der molekularen Biotechnologie und der medizinischen Chemie haben dazu geführt, dass eine Vielzahl neuer Substanzen entdeckt wurde, die eine potenzielle Affinität zum Zielrezeptor aufweisen. Jedoch müssen bei der Weiterentwicklung solcher Wirkstoffmoleküle zum Medikament mehrere Aspekte beachtet werden. Sie müssen auf die Durchlässigkeit, ihren Transport und die Bioverfügbarkeit durch biologische Barrieren untersucht werden. Des Weiteren ist die Entwicklung neuer Technologien erforderlich, um ihren sicheren und effizienten Transport zum Wirkort zu gewährleisten. Daher liegt der Forschungsschwerpunkt der Abteilung „Wirkstofftransport“ zum einen in der Erforschung der biologischen Barrieren selbst, namentlich der Lunge, des Magen-Darm-Traktes und der Haut. Zum anderen beschäftigt sich DDEL mit der Entwicklung geeigneter Trägersysteme, die in der Lage sind, diese epithelialen Barrieren zu überwinden, um das Wirkstoffmolekül an den Zielort zu bringen.

Entwicklung eines neuen *in vitro*-Modells der Blut-Luft-Schranke

Die so genannte „Blut-Luft-Schranke“, die vom Alveolarepithel der Lunge gebildet wird, ist nicht nur von Bedeutung für den pulmonalen Transport von Wirkstoffen, sondern auch im Rahmen von Krankheiten, die durch Aerosole übertragen werden, wie z. B. Schweinegrippe und Tuberkulose. Um die *in vivo*-Situation nachzuahmen, gibt es bereits einige *in vitro*-Zellkulturmodelle (z. B. Tumorzellen, primäre Zellen tierischen Ursprungs), denen allerdings auf



Nico Mehl bringt Kolben mit Proben zum Gefrierdrehen am *Lyophilisator an*. Foto: HZI, Bellhäuser

Grund ihrer geänderten Barriereigenschaften größtenteils die biologische Relevanz fehlt. Primäre humane Zellen spiegeln die *in vivo*-Situation am besten wider, allerdings sind sie nur sehr begrenzt verfügbar und ihre Isolation gestaltet sich zeit- und kostenintensiv.

Daher wird eine neue Zelllinie entwickelt, mit deren Hilfe ein *in vitro*-Modell etabliert wird, das nicht von Tumorzellen abgeleitet ist und intakte Barriereigenschaften aufweist. Dieses System wird es ermöglichen, Infektionspfade über den Respirationstrakt aufzuklären und die Entdeckung von Wirkstoffen zu erleichtern, mit denen solche Infektionskrankheiten behandelt werden können.

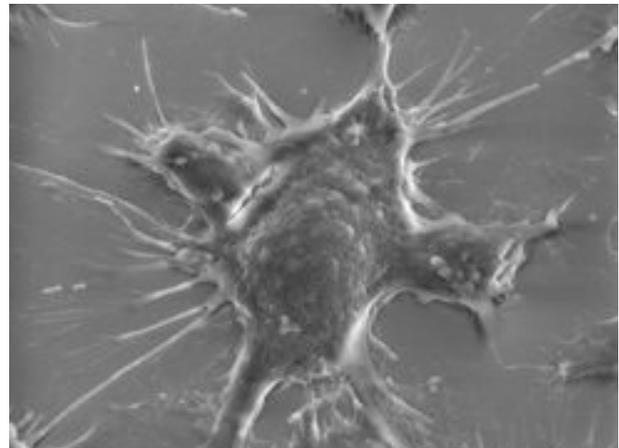
Nadelfreie Impfung über die Haut Die meisten Impfungen werden heutzutage über eine intramuskuläre Injektion verabreicht. Allerdings kann mit dieser Applikationsart der Impfstoff die antigenpräsentierenden Zellen der Haut, die die weitere Immunantwort auslösen, nicht optimal erreichen. Neue Strategien zur nadelfreien Impfung über die Haut schädigen die schützende Hornschichtbarriere über einen signifikanten Zeitraum und sind daher für flächendeckende Impfungen in Ländern mit kritischen Hygienebedingungen ungeeignet.

Kürzlich wurde über eine alternative Impfstrategie berichtet, wobei Nanopartikel über die Haarfollikel zum Hautimmunsystem vordringen. Da bekannt ist, dass Pollenantigene die talggefüllten Follikel schnell durchdringen und bei entsprechend sensibilisierten Personen eine allergische Reaktion auslösen können, soll dieser Mechanismus mit künstlichen, partikulären Impfstoffträgersystemen nachgeahmt werden. Diese Strategie für die Umsetzung der nadelfreien Impfung über die intakte Hautbarriere ist sehr vielversprechend und wird in der Abteilung Wirkstofftransport nun intensiv weiter entwickelt.

Nano- und mikropartikuläre Arzneistoffformulierungen zur Therapie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen wie die *Kolitis ulcerosa* sind Autoimmunerkrankungen des Magen-Darm-Trakts. Die Patienten leiden schubweise unter starken Schmerzen, Magen-Darm-Krämpfen und heftigem, oft blutigem Durchfall. Zudem ist das Risiko, an Darmkrebs zu erkranken, wesentlich erhöht.

In Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass sich Teilchen im Nano- bis Mikrometerbereich gezielt im entzündeten Darmgewebe anreichern. Daher könnten nano- und mikropartikuläre Arzneistoffformulierungen die Therapie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen in naher Zukunft verbessern. In der Abteilung „Wirkstofftransport“



Caco-2 Zelle mit an die Zellmembran adhärennten Propylstärke-Nanopartikeln Foto: HIPS / HZI

werden zur Zeit solche neuartigen Formulierungen für eine ganze Reihe unterschiedlicher antiinfektiöser Wirkstoffe entwickelt. Zusätzlich wurde ein neuartiges Zellkulturmodell der entzündeten Darmmukosa etabliert, das Studien zum Mechanismus der Anreicherung erlaubt.

Design neuer Transportsysteme für Nukleinsäuren

In der nicht-viralen Gentherapie verschiebt sich der Fokus von der Behandlung mutationsbedingter Krankheiten hin zur Anwendung als Schutzimpfung oder Allergiebehandlung. Das erneut zunehmende Interesse ist auf die Entdeckung der RNA-Interferenz zurückzuführen. Es handelt sich dabei um einen Mechanismus zur sequenzspezifischen Inhibition eines Zielgens, der als Therapie für viele unterschiedliche Krankheiten genutzt werden kann. Die physikochemischen Eigenschaften von Nukleotidketten sowie die epithelialen Barrieren verhindern jedoch den effektiven Transport zum Wirkort. Deshalb ist zur Nutzung dieser Therapien ein geeignetes Transportsystem notwendig, welches effizient, sicher und klinisch anwendbar ist. Hierzu entwickeln die Wissenschaftler der Abteilung DDEL aus aktuellen Ansätzen der Polymerchemie und Nanotechnologie eigene Formulierungen. In diesen wird der Wirkstoff entweder komplex gebunden (Polyrotaxane als kationische Partner zur Komplexierung der anionischen Nukleinsäuren) oder in Nanopartikeln eingekapselt (*core-shell* Trägerpartikel auf Basis biodegradierbarer Polymere wie Chitosan-umhüllte PLGA-Partikel). Ziel ist die Entwicklung von Trägersystemen, die durch kontrollierbare physikalische und pharmakokinetische Eigenschaften an unterschiedliche Applikationsrouten anpassbar sind. Zunächst werden diese Transportsysteme für die Aufnahme über die Lunge und in späteren Projekten auch über den Verdauungstrakt optimiert werden.



TWINCORE, Zentrum für experimentelle und klinische Infektionsforschung GmbH



GESCHÄFTSFÜHRENDER DIREKTOR | Prof. Dr. Ulrich Kalinke

INSTITUT FÜR EXPERIMENTELLE INFektionsFORSCHUNG | Prof. Dr. Ulrich Kalinke

ABTEILUNG FÜR EXPERIMENTELLE VIROLOGIE | Prof. Dr. Thomas Pietschmann

INSTITUT FÜR INFektionsIMMUNOLOGIE | Prof. Dr. Tim Sparwasser

ABTEILUNG FÜR PATHOPHYSIOLOGIE BAKTERIELLER BIOFILME | Prof. Dr. Susanne Häußler

ARBEITSBEREICH ZELL- UND GENTHERAPIE | Prof. Dr. Michael Ott

TWINCORE, das Translationszentrum von HZI und MHH TWINCORE, Zentrum für Experimentelle und Klinische Infektionsforschung GmbH ist eine Gemeinschaftseinrichtung des Helmholtz-Zentrums für Infektionsforschung (HZI) in Braunschweig und der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH). Ziel von TWINCORE ist es, die herausragenden Expertisen von HZI und MHH im Bereich der Infektionsforschung in einem gemeinsamen Zentrum unter dem Gesichtspunkt der Translationsforschung zu fördern und weiterzuentwickeln. Dabei soll die translationale Forschung so interpretiert werden, dass einerseits neueste Erkenntnisse aus der Grundlagenforschung leichter ihren Weg zum Patienten finden und umgekehrt, dass offene Fragen aus der klinischen Praxis zur Kenntnis der Forscher gelangen. Ein wichtiger Teil der Arbeit am TWINCORE ist auch die wissenschaftliche Auseinandersetzung mit regulatorischen Fragen im Zusammenhang mit der Beantragung und Durchführung von klinischen Prüfungen. Insbesondere im Vorfeld früher klinischer Prüfungen treten vermehrt komplexe Fragen auf wie z.B. die Aussagekraft von Tierexperimenten für die Bestimmung der Sicherheit und Effizienz neuer Arzneimittel. TWINCORE trägt dazu bei, dass neue Behandlungsoptionen zur Prophylaxe und Therapie von Infektionserkrankungen erarbeitet werden, und dass im Vorfeld der Erprobung neuer Ansätze im Menschen eine solide wissenschaftliche Basis zur Minimierung von Risiken erarbeitet wird. Die Forschung am TWINCORE fokussiert sich auf die Analyse von Erreger-Wirt-Interaktionen. Aus diesen Kenntnissen können sich neue Ansätze zur Hemmung von Erregern und zur Entwicklung neuer Impfstrategien ableiten. Schließlich sollen neue vorklinische Modelle erarbeitet werden. Am TWINCORE finden sich Laboratorien, in denen Experimente bis zur Sicherheitsstufe S3** durchgeführt werden können. Weiterhin ist im Rahmen des 2. TWINCORE-Symposiums 2010 mit dem Titel "Antimicrobials and Vaccines" am 12.08.2010 das frisch renovierte Tierhaus am TWINCORE eingeweiht worden (siehe Abb. 1). In dem Tierhaus können mehr als 2000 Mausekiden betrieben werden. Auch lassen sich in dem Tierhaus Experimente bis zur Sicherheitsstufe S3** durchführen. Am TWINCORE hat sich neben dem TWINCORE-Symposium ein vielfältiges Vortragsprogramm etabliert, in dem Translationsforscher und Grundlagenforscher über ihre Ergebnisse referieren.

Im Folgenden werden die 4 Forschungsfelder von TWINCORE skizziert.

1. Analyse der Pathogen-Wirt-Interaktionen Im Rahmen einer entwicklungsgeschichtlich meist sehr weit zurückreichenden Koevolution von Erregern und ihrem Wirt haben sich komplexe Überlebensstrategien sowohl der Wirts- als auch der Pathogen-Populationen herausgebildet. Auf der Zellebene spielen dabei intrinsische Immunmechanismen eine Rolle. Am TWINCORE untersuchen wir den Einfluss solcher Mechanismen auf die Wirts- und Gewebespezifität von Krankheitserregern. Seit einigen Jahren ist bekannt, dass zusätzlich zur Erkennung fremdartiger Eigenschaften, das Wahrnehmen von „Gefahrensignalen“ durch Mustererkennungsrezeptoren (PRR) eine zentrale Rolle bei der Induktion schützender Immunität spielt. Mechanismen der PRR-vermittelten Stimulation angeborener Immunmecha-

nismen und die Konsequenzen dieser Aktivierung auf die pathogenspezifische Immunität werden intensiv erforscht. Bei diesen Arbeiten werden sowohl akute als auch chronische Infektionsverläufe und die damit verbundenen entzündlichen Reaktionen untersucht. Pathogene haben verschiedene Strategien entwickelt, die Wirtsimmunität zu unterwandern. Es werden Pathogen-kodierte Faktoren gesucht, die Immunantworten modulieren. Darüber hinaus wird der Einfluss regulatorischer sowie inflammatorischer T-Zellen auf den Verlauf von Infektionen untersucht.

2. Neue Pathogen-Inhibitionsmechanismen Nach dem überwältigenden Erfolg von Antibiotika bei der Behandlung von bakteriellen Infektionen, wurden in den letzten Jahrzehnten wichtige Durchbrüche bei der Entwicklung antiviraler Substanzen erzielt. Neue Ansätze zur Hemmung der Erregervermehrung werden am TWINCORE gesucht. In



Abb. 1. Im Rahmen des 2. TWINCORE-Symposiums „Antimicrobials and Vaccines“ wurde am 12.08.2010 das frisch renovierte Tierhaus am TWINCORE eingeweiht. (linke Abbildung). Der TWINCORE-Haupteingang mit dem Symposiumstransparent. (rechte Abbildung). Das „rote Band“ wurde bei der Eröffnung des neuen Tierhauses gemeinsam von Prof. Bitter-Suermann (MHH), Prof. Wehland (HZI), Herrn Gevers (MWK) und Prof. Kalinke (TWINCORE) durchschnitten (von links nach rechts). Fotos: HZI/Twincore

Zusammenarbeit mit dem HZI und der Universität Hannover werden biologische Substanzbibliotheken hinsichtlich antiviral und antibakteriell wirksamer Substanzen untersucht. Dies beinhaltet die Nutzung neuer Zellkulturmethoden, die z. B. die gezielte Suche nach Hemmstoffen der Hepatitis C Virus (HCV) Replikation erlauben. Ein weiterer Schwerpunkt liegt auf der Suche nach Inhibitoren der Ausbildung bakterieller Biofilme, die bei chronischen Infektionsverläufen auftreten können. Ebenso werden neue Gentherapie-Ansätze zur Behandlung von Infektionskrankheiten gesucht. Darüber hinaus wird geprüft, ob pathogenkodierte Immunmodulatoren potenzielle Zielstrukturen für neue therapeutische Ansätze darstellen.

3. Neue Impfstrategien In der breiten Öffentlichkeit werden „Impfungen“ als eine der erfolgreichsten medizinischen Errungenschaften wahrgenommen. Dennoch gibt es weiterhin zahlreiche Infektionskrankheiten, für die keine Impfstoffe zur Verfügung stehen. Daher werden am TWINCORE neue Impfstrategien entwickelt. Neben der Untersuchung virusähnlicher Partikel zum Einsatz als Impfvektoren spielt dabei die *in vivo*-Beladung spezifischer dendritischer Zellen mit Antigenen eine Rolle. Eine interessante Option ist die Verstärkung von Immunantworten durch die Beeinflussung regulatorischer T-Zellen. Es gibt derzeit nur wenige zugelassene Hilfsstoffe zur Verstärkung von Immunantworten nach einer Impfung. Solche Hilfsstoffe, die auch als Adjuvantien bezeichnet werden, werden zusammen mit Partnern am HZI untersucht. Weiterhin wird erforscht, ob Zytokine als natürliche Hilfsstoffe bei ausgewählten Impfprotokollen eine Rolle spielen. Ein weiterer Schwerpunkt ist die Analyse der Mechanismen, die die Induktion lang anhaltender IgG-Antworten unterstützen.

4. Neue vorklinische Modelle In der Grundlagenforschung entwickelte neue therapeutische oder prophylaktische Ansätze müssen umfangreichen vorklinischen Tests unterzogen werden, bevor Studien am Menschen vorgenommen werden können. Am TWINCORE werden neue Modelle entwickelt, die eine verbesserte Vorhersage im Hinblick auf die Reaktionen im Menschen ermöglichen. Dabei stellt die

Humanisierung von Mäusen einen vielversprechenden Ansatz dar. Dabei können einerseits Mäuse mit menschlichen Zellen behandelt werden, um die Entwicklung von Bestandteilen des menschlichen Immunsystems oder der menschlichen Leber in den Tieren zu ermöglichen. Zum anderen wird auch die genetische Humanisierung von Mäusen zum Beispiel durch bakterielle künstliche Chromosomen (BAC)-vermittelte Transgenese vorgenommen. Auf diese Art werden menschliche Rezeptoren und in der menschlichen Bevölkerung gelegentlich auftretende Varianten von Rezeptoren exprimiert, um so ihre Funktion in Tiermodellen zu untersuchen. Eine weitere Thematik ist die Untersuchung von Effekten, die durch die konstanten Anteile von Antikörpern vermittelt werden. Dieses Thema ist insbesondere im Zusammenhang mit therapeutisch monoklonalen Antikörpern relevant.



Ein Blick auf das TWINCORE-Gebäude, Zentrum für Experimentelle und Klinische Infektionsforschung GmbH. Neben den modernen Labors und den hochwertigen Ausstattungungen verfügt TWINCORE auch über optimale Räumlichkeiten, in denen wissenschaftliche Besprechungen und Seminare durchgeführt werden können. Foto: HZI/Twincore

Arbeitsgruppen am TWINCORE TWINCORE ist im August 2008 feierlich eingeweiht worden. Seit 2009 sind alle wichtigen Leitungspositionen besetzt. Derzeit arbeiten am TWINCORE Prof. Kalinke als Geschäftsführender Direktor von TWINCORE und als Direktor des Instituts für Experimentelle Infektionsforschung, Prof. Pietschmann als Leiter der Abteilung für Experimentelle Virologie, Prof. Sparwasser als Direktor des Instituts für Infektionsimmunologie und Frau Prof. Häußler als Leiterin der Abteilung für Pathophysiologie Bakterieller Biofilme. Weiterhin ist die von Prof. Ott geleitete Translationale Forschungsgruppe für Zell- und Gentherapie am TWINCORE beheimatet. Diese Gruppe ist von Herrn Prof. Manns, Direktor der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie der MHH, an das TWINCORE entsandt worden. Derzeit arbeiten insgesamt 98 Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter am TWINCORE.



Die Leiter der TWINCORE-Forschungsgruppen (von links nach rechts): Profs. Susanne Häußler, Michael Ott, Thomas Pietschmann, Geschäftsführer Ulrich Kalinke und Tim Sparwasser.

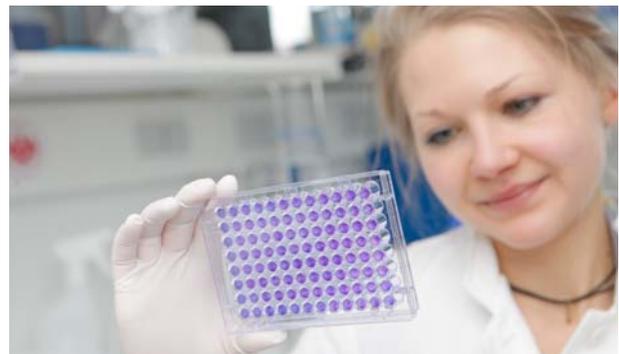
Foto: HZI, Gramann



Theresa Frenz während der Arbeit unter einer sterilen Werkbank Foto: Twincore/HZI

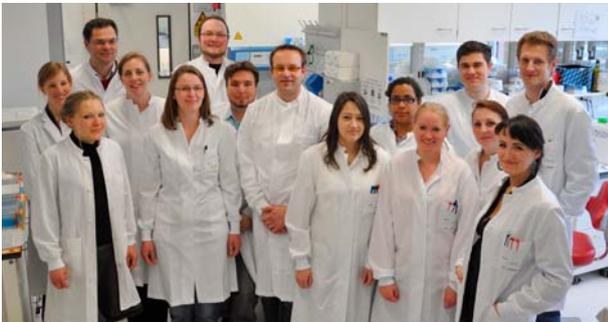
Die Forschungsgruppe um Prof. Dr. Ulrich Kalinke |

ulrich.kalinke@twincore.de Nach einer Virusinfektion werden in der Regel innerhalb von Stunden Typ I Interferon-Antworten induziert, die für die ersten Tage das Überleben des Wirts sichern. Erst nach ungefähr einer Woche wird das adaptive Immunsystem so weit aktiviert, dass es in der Lage ist, Pathogene zu eliminieren. In früheren Projekten haben wir gefunden, dass nach einer Infektion mit dem vesikulären Stomatitis Virus (VSV) eine kleine Anzahl hoch spezialisierter Zellen, die auch als plasmazytoide dendritische Zellen (pDC) bezeichnet werden, über das Triggering von PRR aktiviert werden, um große Mengen an schützendem Typ I Interferon zu produzieren. Interessanterweise entwickeln praktisch alle genauer untersuchten Viren Gegenmaßnahmen zur Hemmung der Induktion oder der Funktion von Typ I Interferon-Antworten. Ein Schwerpunkt unserer Arbeit besteht darin herauszufinden, wie unterschiedliche Viren Typ I Interferon-Antworten induzieren und welche Strategien sie entwickelt haben, Typ I Interferon-Antworten zu unterwandern. Die lokalen Verhältnisse von Typ I Interferon-Antworten beeinflussen entscheidend den Krankheitsverlauf. Wir untersuchen, wo Typ I Interferon-Antworten induziert werden und welche Zelltypen induziert werden müssen, damit Schutz vermittelt wird. Dabei spielt die Untersuchung der Mechanismen, die die Ausbreitung von viralen Erregern im Zentralnervensystem hemmen, eine wichtige Rolle. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass Typ I Interferon auch eine direkte Auswirkung auf die Funktion von Immunzellen haben kann. Zurzeit untersuchen wir, wie Typ I Interferon, das bei einer Impfung mit Virus-ähnlichen Partikeln induziert wird, die Bildung von lang anhaltenden IgG-Antikörper-Antworten beeinflusst. Antikörper sind vergleichsweise große Moleküle, deren variable Anteile Antigene spezifisch binden, während ihre konstanten Elemente über sogenannte Fc-Rezeptoren gebunden werden können. Diese Fc-Rezeptoren werden von bestimmten Immunzellen und anderen Körperzellen exprimiert. Wir untersuchen, wie Interaktionen von Fc-Rezeptoren mit IgG Antikörpern verschiedener Subklassen



Claudia Soldner analysiert Ergebnisse aus einem Experiment

Foto: Twincore/HZI

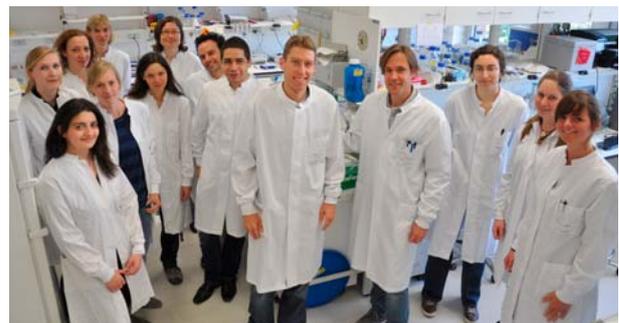


Die Arbeitsgruppe von Prof. Ulrich Kalinke (v. l. n. r.): Ulrich Kalinke, Robert Bittorf (hintere Reihe), Linda Semmler, Theresa Frenz, Marius Döring (Reihe davor), Claudia Soldner, Annett Keßler, Christian Mers, Jennifer Paijo, Claudia Detje, Lukas Graalmann, Patrick Bartholomäus; in der ersten Reihe rechts Sabrina Heindorf, Stephanie Vogel, Julia Heinrich Foto: Twincore/HZI

interagieren und welche Immunfunktionen so beeinflusst werden. Diese Frage ist besonders für therapeutisch genutzte monoklonale Antikörper relevant, weil solche Reagenzien eine immer wichtigere Rolle als innovative Arzneimittel bei der Behandlung von Tumoren, Autoimmunerkrankungen und Infektionen spielen. Um die Ergebnisse aus den oben beschriebenen Ansätzen noch besser bei der Beantragung und Durchführung klinischer Prüfungen anzuwenden, werden gemeinsam mit dem Paul-Ehrlich-Institut Untersuchungen im Bereich der regulatorischen Forschung durchgeführt.

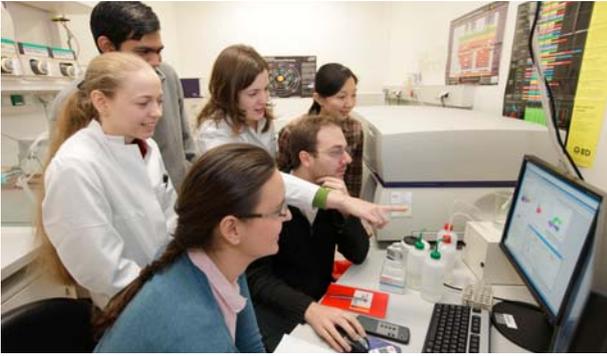
Die Forschungsgruppe um Prof. Dr. Thomas Pietschmann | thomas.pietschmann@twincore.de Die Infektion mit dem Hepatitis C Virus, das zur Familie der Flaviviren gehört, ist eine der Hauptursachen der chronischen Hepatitis. Nach WHO-Schätzungen sind weltweit bis zu 170 Millionen Menschen chronisch infiziert. Wir entwickeln und nutzen neue Zellkulturtechniken für die Erforschung der HCV-Replikation. Ziel dieser Forschung ist es, die molekularen Mechanismen der HCV-Replikation in Leberzellen zu untersuchen. Insbesondere werden dabei die frühen Stadien der HCV-Infektion untersucht, während der das Virus in die Leberzellen eindringt. Weiterhin analysieren wir die Prozesse, die zur Verpackung des Virusgenoms in neue Viruspartikel sowie zur Ausschleusung der Nachkommen aus der infizierten Wirtszelle führen. Damit versuchen wir, die Grundlagen der Infektionsstrategie dieses humanpathogenen Virus zu verstehen, um daraus neue Verfahren und Perspektiven für die Therapie zu entwickeln. Bei den TWINNING-Projekten mit den Partnern an der MHH und dem HZI verwenden wir das HCV-Zellkultursystem zur Identifizierung neuer Substanzen, die die HCV-Replikation hemmen. Desweiteren beteiligen wir uns im Rahmen der Helmholtz-Allianz für Krebsimmuntherapie an der Entwick-

lung neuer Immuntherapieverfahren für die Behandlung der chronischen HCV-Infektion und des mit dem HCV in Zusammenhang stehenden Leberzellkarzinoms. Einen neuen Schwerpunkt bilden unsere Untersuchungen zum HCV Spezies- und Gewebetropismus. HCV vermehrt sich in der Leber und infiziert neben dem Menschen nur Schimpansen. Die Mechanismen, die für diesen engen Spezies- und Gewebetropismus verantwortlich sind, wurden bisher kaum untersucht und sind nur unzureichend verstanden. Mit unserer Forschung auf diesen Themengebieten wollen wir verstehen, wie extrahepatische Virusreservoirs die Viruspathogenese und das Therapieansprechen beeinflussen können, wie HCV essentielle zelluläre Kofaktoren nutzt und welche Wirtsfaktoren die HCV Replikation kontrollieren. Schließlich tragen diese Studien zur Entwicklung von immunkompetenten Kleintiermodellen bei, um in Zukunft Mechanismen der Immunkontrolle und Pathophysiologie der HCV-Infektion zu untersuchen.



Die Arbeitsgruppe von Prof. Thomas Pietschmann (v. l. n. r.): Kathrin Hüging, Nikoleta Bodosoglou, Juliane Dörrbecker, Dorothea Bankwitz, Christina Grethe, Juliane Gentsch, Sibylle Haid, Nicolas Menzel, Patrick Chhatwal, Eike Steinmann, Thomas Pietschmann, Gabrielle Vieyres, Stephanie Pfänder, Anne Frentzen (es fehlen: Joachim Hain, Martina Friesland, Sandra Ciesek) Foto: Twincore/HZI

Die Forschungsgruppe um Prof. Dr. Tim Sparwasser | tim.sparwasser@twincore.de Unser Schwerpunkt liegt auf der Untersuchung der Bedeutung der PRR – beispielsweise aus der Familie der Toll-like Rezeptoren (TLRs) und der Typ C-Lektine – für die Aktivierung der wichtigsten positiven Regulatoren des Immunsystems und der Initiatoren der adaptiven Immunität: des dendritischen Zellsystems (DC). Einen weiteren Schwerpunkt bilden dabei die regulatorischen T-Zellen (Tregs), dem wichtigsten Pendant zu den DCs. Tregs nutzen Mechanismen zur Hemmung einer überschießenden Immunreaktion und zur Begrenzung der Proliferation der T-Effektorzellen, die bis jetzt noch nicht vollständig verstanden sind. Eine optimale Impfstrategie gegen Pathogene kann beispielsweise in der



Nicole Fisch, Venkateswaran Ganesh, Wiebke Ginter, Catharina Schrauf, Christian Mayer und Ina Lu (v. l. n. r.) bei der gemeinsamen Analyse von Scatter Plots Foto: Twincore/HZI

Aktivierung spezifischer DC-Unterpopulationen bei gleichzeitiger Vermeidung der Treg-Expansion oder Induktion bestehen. Impfstudien zu Tregs und DCs im Mausmodellsystem unterliegen jedoch dahingehend Einschränkungen, dass *in vivo*-Analysen von Tregs und DC-Unterpopulationen äußerst schwierig sind. Zum Beispiel kommen Unterpopulationen von DCs in verschiedenen lymphatischen Organen nur in sehr kleiner Zahl vor. Diese haben in unterschiedlichen Fällen hochspezialisierte Aufgaben, wozu auch die Induktion der Toleranz gehört. Da diese „regulatorischen Immunzellen“ gewöhnlich hoch sensibel auf eine *Ex vivo*-Isolierung reagieren und sich bis heute noch nicht gut genug *in vivo* handhaben lassen, ist das Wissen über die Funktion und Bedeutung der Tregs und DC-Unterpopulationen für die adaptiven Immunreaktionen immer noch unvollständig. Eines der Hauptziele ist daher die Entwicklung molekularer Werkzeuge, mit denen eine genetische Manipulation der DCs und Tregs möglich ist. Wir wollen diese Modelle zur Untersuchung der Funktion von Tregs und Unterpopulationen von DCs bei der Infektion, Allergie und Toleranz verwenden. In humanisierten Modellen wird die Rolle der PRRs, wie z.B. des menschlichen TLR7 und DC-SIGN, analysiert, und es werden auf diese Moleküle ausgerichtete Impfstrategien *in vivo* getestet. Am Institut von Prof.

Sparwasser baut Dr. Matthias Lochner derzeit eine Arbeitsgruppe auf, deren Schwerpunkt auf der Untersuchung der Rolle von DCs bei der Induktion und Kontrolle von inflammatorischen (Th17) und regulatorischen T-Zellpopulationen bei Infektionen und Entzündungsreaktionen im Darm liegt.

Die Forschungsgruppe um Prof. Dr. Susanne Häußler | susanne.haeussler@twincore.de Die Erfolge der modernen Medizin werden zunehmend durch opportunistische bakterielle Infektionen beeinträchtigt. Bei chronischen bakteriellen Infektionen können sich die Erreger häufig in sogenannten Biofilmen zusammenschließen und sind dann besser vor Angriffen durch Zellen des Immunsystems oder Antibiotika geschützt. Außerdem verschafft das Leben in der Population den Bakterien zusätzliche Anpassungsmechanismen auf Stresssituationen, die über die üblichen Reaktionen von Einzelzellen hinausgehen. Bei Mukoviszidose-Patienten mit einer chronischen Lungeninfektion ist *Pseudomonas aeruginosa* der dominante pathogene Erreger. Obwohl die meisten Patienten mit nur einem *P. aeruginosa* Klon befallen sind, finden sich in der Lunge verschiedene bakterielle Morphotypen. Diese Diversität scheint eine große Rolle bei der Persistenz des Keims und damit bei der Ausbildung einer chronischen Infektion zu spielen. Wir wollen die molekularen Mechanismen aufklären, die der Generierung dieser Diversität zugrunde liegen. Bei Mukoviszidose-Patienten mit einer chronischen *P. aeruginosa*-Infektion der Lunge finden sich gehäuft sogenannte „Small Colony Variants“ (SCVs), die besonders effizient Biofilme ausbilden. Um die Mutationen zu identifizieren, die zur Entstehung solcher SCVs führen, sequenzieren wir die Genome von klinischen *P. aeruginosa*-Isolaten mittels der sogenannten „next generation sequencing“-Technologie. Bei der vergleichenden Analyse der chromosomalen DNA Sequenz von *P. aeruginosa*-Isolaten mit ähnlichen phänotypischen Eigenschaften, suchen wir nach typischen Basenaustauschen, und überprüfen, ob diese ursächlich an der Ausprägung des Phänotyps beteiligt sind. In der Zukunft wollen wir so klinisch relevante adaptive Mutationen identifizieren, die in *P. aeruginosa* unter *in vitro* Biofilm-Wachstumsbedingungen und *in vivo* im Laufe einer chronischen Infektion entstehen. Das Wissen um die



Die Arbeitsgruppe von Prof. Tim Sparwasser (von links nach rechts): Christina Hesse, Christian Klemann, Amrita Nandan, Matthias Lochner, Stefanie Pohl, Christian Mayer, Zuobai Wang, Franz Puttur, Catharina Schrauf, Luciana Berod, Christopher van Helt, Julia Huntenburg, Wiebke Ginter, Nicole Fisch, Martina Thiele, Stephanie Dippel, Christine Jänke, Janika Quindt, Esther Ermeling, Abdul Mannan Baru, Venkateswaran Ganesh, Siona Hauer, Tim Sparwasser. Foto: Twincore/HZI

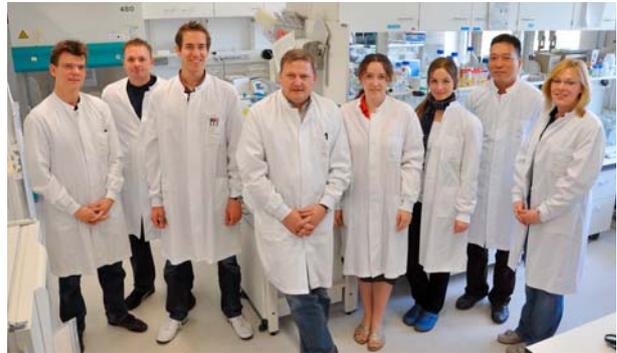
Genotypen, die zu unterschiedlichen Infektionsstadien selektioniert werden, soll uns helfen, neue erfolgsversprechende Therapiestrategien zu entwickeln. *P. aeruginosa* produziert neben zwei gut charakterisierten Homoserinlaktone-Signalmolekülen ein drittes interbakterielles Signalmolekül, das Pseudomonas Quinolone Signal (PQS). PQS reguliert in Abhängigkeit von der Zelldichte - ebenso wie die Homoserinlaktone - die Produktion von Virulenzfaktoren und ist essentiell an der Etablierung von *P. aeruginosa*-Biofilmen beteiligt. Der molekulare Mechanismus der Umsetzung des PQS Signals in ein bakterielles Verhalten auf Einzelzellebene ist allerdings weitgehend unbekannt. Ein Enzym, das von *pqsE*, dem letzten Gen auf dem PQS Biosynthese-Operon, kodiert ist, scheint dabei eine zentrale Rolle zu spielen. Die Aufklärung der Funktion von *PqsE* ist ein Forschungsschwerpunkt unserer Arbeitsgruppe.



Prof. Susanne Häußler während einer Besprechung mit ihren Mitarbeitern (v. l. n. r.): Vera Nöding, Kathi Klimmek, Susanne Häußler, Mathias Müsken, Andrea Blanka Foto: Twincore/HZI

Die Forschungsgruppe um Prof. Dr. Michael Ott |

ott.michael@mh-hannover.de Wir entwickeln zell- und gentherapeutische Verfahren für die Behandlung von vererbten Leberkrankheiten. Ein weiterer Schwerpunkt ist die Entwicklung eines Mausmodells mit chimärem Lebergewebe vom Menschen/von der Maus und dem menschlichen Immunsystem zur Erforschung von Impfstrategien gegen HIV und HCV. Die Repopulation der Leber mit menschlichen Leberzellen und die Transplantation von menschlichen Stammzellen in Mäusen mit einem Immundefekt stellen weiterhin eine große Herausforderung an die Wissenschaft dar. Um an der *alb-uPA*-transgenen, immundefizienten (*RAG γ c*) Maus Impfstrategien erforschen zu können, ist der Einsatz von menschlichen Zellen eines Spenders zur Repopulation in der Maus erforderlich. Dort, wo Primärgewebe als Ausgangsmaterial verwendet wird, ist die Isolierung der beiden Zellpopulationen nur unter Verwendung von Lebergewebe aus Föten möglich. Bei unseren Transplantationsexperimenten hat sich herausgestellt, dass die Transplantation von Fötushepatoblasten eindeutig



Die Arbeitsgruppe von Prof. Michael Ott (v. l. n. r.): Johan Waern, Michael Rothe, Martin Pacher, Michael Ott, Urda Rüdrich, Gesa Riedel, Quinggong Yuan, Ina Rittelmeyer (es fehlt Michael Bock). Foto: Twincore/HZI

ineffizienter ist als die Transplantation von primären Hepatozyten von Erwachsenen. Alternativ dazu konnte die Forschungsgruppe zum ersten Mal die Transplantation von Lebergewebe menschlicher Föten unter die Kapsel der zu testenden Leber des Empfängers durchführen. Die ersten kombinierten Transplantationen von menschlichen Blutstammzellen und von Fötuslebergewebe in einen neu entwickelten Mausstamm sollen bald stattfinden. Aufgrund der mangelnden Verfügbarkeit von primärem menschlichen Zellmaterial zur Humanisierung des Mausmodells sowie zur Zelltherapie beim Menschen führt die Forschungsgruppe umfangreiche Untersuchungen zur Erschließung alternativer Quellen für die Bereitstellung von Zellmaterial durch. In Zusammenarbeit mit anderen MHH-Gruppen und internationalen Partnern wird zurzeit an hepatischen Differenzierungsprotokollen für embryonale Stammzellen und iPS-Zellen geforscht. Ein anderes Projekt analysiert die Risiken der Insertionellen Mutagenese beim lentiviralen Gentransfer. Durch eine Serientransplantation von *ex vivo* genetisch modifizierten Hepatozyten lässt sich die Inzidenz von Lebertumoren in Abhängigkeit von der Anzahl der lentiviralen Insertionen untersuchen. Desweiteren leitet die Forschungsgruppe eine klinische Studie über Zelltransplantation bei Patienten mit einer Harnstoffzyklusstörung. Mit diesem Projekt wird die weltweit erste kontrollierte Studie über die Zelltherapie bei erblich bedingten Leberstoffwechselerkrankungen durchgeführt.

Schlüsselpublikationen von TWINCORE Im Jahr 2010 konnten von Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern am TWINCORE insgesamt 54 Artikel publiziert werden. In 2011 sind 24 Artikel entweder bereits veröffentlicht oder befinden sich im Druck (siehe „Vollständige Liste aller von Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern am TWINCORE in 2010 und 2011 veröffentlichter und in Druck befindlicher Publikationen“). Besonders wichtige Forschungsergebnisse sind auf den folgenden Gebieten erarbeitet worden:

1. Regulatorische T-Zellen bei der therapeutischen Immunmodulation

Bisher gegen Tumore erprobte therapeutische Impfungen haben nur geringe oder keine Erfolge gezeigt. Nun ist es in einem Mausmodell gelungen, durch selektive Depletion regulatorischer T-Zellen den therapeutischen Impferfolg bei der Behandlung des malignen Melanoms zu verbessern (Klages et al., 2010). In einem weiteren Projekt konnte ein wichtiger Beitrag für ein besseres Verständnis der Regulationsmechanismen des Immunsystems im Darm geleistet werden (Sawa et al., 2010).

2. Mechanismen der Hepatitis C Virus Replikation und -Immunkontrolle

Bei einer Hepatitis C Virus (HCV)-Infektion spielen Spezies-spezifische Interaktionen mit Oberflächenrezeptoren wie CD81 eine zentrale Rolle. Entsprechend werden natürlicherweise nur Schimpansen und Menschen mit HCV infiziert. Nach Adaption von HCV an Maus-CD81 konnten drei Mutationen in den Hüllproteinen von HCV identifiziert werden, die die Infektion von Zellen mit murinem CD81 100-fach verstärken (Bitzegeio et al., 2010) und dadurch den HCV Zelleintritt in Mauszellen ohne Hilfe humaner Kofaktoren ermöglichen. Diese Arbeiten lassen hoffen, dass es eines Tages gelingen wird, ein für HCV permissives, immunkompetentes Kleintiermodell zu etablieren.

3. Pathogenerkennung und Immunstimulation durch Dendritische Zellen

Virus-induzierte Typ I Interferon-Antworten können zytotoxische T-Zellantworten massiv verstärken. Dieser Befund ist überraschend, weil IFN-Antworten innerhalb von Stunden nach einer Virusinfektion maximale Serumlevel erreichen, während zytotoxische T-Zellantworten erst nach einer knappen Woche maximal induziert sind. Die Arbeiten von Frenz et al. haben gezeigt, dass IFN-Antworten sowohl über die Stimulation von Antigen-präsentierenden Zellen als auch über die direkte Stimulation von T-Zellen ihre immunverstärkende Funktion vermitteln (Frenz et al., 2010).

4. Immununterwanderungsstrategien Im Rahmen von chronischen bakteriellen Infektionen können sich Biofilme ausbilden, die sich mit normalen Antibiotika nicht mehr behandeln lassen. Es ist gelungen, ein neues *in vitro*-Testsystem zu entwickeln, das die gezielte Suche von neuen Substanzen erlaubt, die die Biofilmbildung inhibieren (Pommerenke et al., 2010).

5. Humanisierte Mausmodelle Therapieoptionen für verschiedenste Lebererkrankungen sind dadurch eingeschränkt, dass syngene Hepatozyten in der Regel nicht zur Verfügung stehen. Im Maussystem ist es geglückt, ein neues Verfahren zu entwickeln, das die Differenzierung von induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS) in Hepatozyten-ähnliche Zellen erlaubt (Sancho-Bru et al., 2010).

- Bitzegeio J, Bankwitz D, Hueging K, Haid S, Brohm C, Zeisel MB, Herrmann E, Iken M, Ott M & Baumert TF, Pietschmann T (2010) Adaptation of hepatitis C virus to mouse CD81 permits infection of mouse cells in the absence of human entry factors. *PLoS Pathogens* 6: e1000978.
- Frenz T, Waibler Z, Hofmann J, Hamdorf M, Lantermann M, Reizis B, Tovey MG, Aichele P, Sutter G & Kalinke U (2010) Concomitant IFNAR-triggering of T cells and of DC is required to promote maximal MVA-induced T-Cell expansion. *European Journal of Immunology* 40(10), 2769-2777.
- Klages K, Mayer CT, Lahl K, Loddenkemper C, Teng MW, Ngiew SF, Smyth MJ, Hamann A, Huehn J & Sparwasser T (2010) Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells improves effective therapeutic vaccination against established melanoma. *Cancer Research* 70(20), 7788-7799.
- Pommerenke C, Müsken M, Becker T, Dotsch A, Klawonn F & Häussler S (2010) Global genotype-phenotype correlations in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathogens* 6(8). pii: e1001074.
- Sancho-Bru P, Roelandt P, Narain N, Pauwelyn K, Notelaers T, Shimizu T, Ott M & Verfaillie C (2010) Directed differentiation of murine-induced pluripotent stem cells to functional hepatocyte-like cells. *Journal of Hepatology* 54(1), 98-107.
- Sawa S, Cherrier M, Lochner M, Satoh-Takayama N, Fehling HJ, Langa F, Di Santo JP & Eberl G (2010) Lineage relationship analysis of RORγt+ innate lymphoid cells. *Science* 330(6004), 665-669.

Kontakt

TWINCORE GmbH
Zentrum für Experimentelle und Klinische
Infektionsforschung
Feodor-Lynen-Str. 7 | 30625 Hannover
Telefon 0511 2200 27 0 | Fax 0511 2200 27 186
twincore@twincore.de | www.twincore.de

TWINCORE

Zentrum für Experimentelle
und Klinische Infektionsforschung



Medizinische Hochschule
Hannover



HELMHOLTZ
ZENTRUM FÜR
INFEKTIONSFORSCHUNG

Vollständige Liste aller von Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern am TWINCORE in 2010 und 2011 veröffentlichter und in Druck befindlicher Publikationen

Forschungsgruppe um Prof. Kalinke

- 1. Williams SK, Fairless R, Weise J, Kalinke U, Schulz-Schaeffer W & Diem R (2011) Neuroprotective effects of the cellular prion protein in autoimmune optic neuritis. *American Journal of Pathology* (in press).
- 2. Gratz MS, Suezter Y, Kremer M, Volz A, Majzoub M, Hanschmann KM, Kalinke U, Schwantes A & Sutter G (2011) N1L is a virulence factor of ectromelia virus and essential for *in vivo* spread upon respiratory infection. *Journal of Virology* (in press).
- 3. Grabski E, Waibler Z, Schule S, Kloke BP, Sender LY, Panitz S, Cichutek K, Schweizer M & Kalinke U (2011) Comparative analysis of transduced primary human dendritic cells generated by the use of three different lentiviral vector systems. *Molecular Biotechnology* **47**(3), 262-269.
- 4. Kochs G, Bauer S, Vogt C, Frenz T, Tschopp J, Kalinke U & Waibler Z (2010) Thogoto virus infection induces sustained type I interferon responses that depend on RIG-I-like helicase signaling of conventional dendritic cells. *Journal of Virology* **84**(23), 12344-12350.
- 5. Frenz T, Waibler Z, Hofmann J, Hamdorf M, Lantermann M, Reizis B, Tovey MG, Aichele P, Sutter G & Kalinke U (2010) Concomitant IFNAR-triggering of T cells and of DC is required to promote maximal MVA-induced T-Cell expansion. *European Journal of Immunology* **40**(10), 2769-2777.
- 6. Goossens P, Gijbels MJ, Zernecke A, Eijgelaar W, Vergouwe MN, van der Made I, Vanderlocht J, Beckers L, Buurman WA, Daemen MJ, Kalinke U, Weber C, Lutgens E & de Winther MP (2010) Myeloid type I interferon signaling promotes atherosclerosis by stimulating macrophage recruitment to lesions. *Cell Metabolism* **12**(2), 142-153.
- 7. Lang PA, Recher M, Honke N, Scheu S, Borkens S, Gailus N, Krings C, Meryk A, Kulawik A, Cervantes-Barragan L, Van Rooijen N, Kalinke U, Ludewig B, Hengartner H, Harris N, Häussinger D, Ohashi PS, Zinkernagel RM & Lang KS (2010) Tissue macrophages suppress viral replication and prevent severe immunopathology in an interferon-I-dependent manner in mice. *Hepatology* **52**(1), 25-32.
- 8. Prinz M & Kalinke U (2010) New lessons about old molecules: how type I interferons shape Th1/Th17-mediated autoimmunity in the CNS. *Trends in Molecular Medicine* **16**(8), 379-386. Review.
- 9. Murikinati S, Juttler E, Keinert T, Ridder DA, Muhammad S, Waibler Z, Ledent C, Zimmer A, Kalinke U & Schwaninger M (2010) Activation of cannabinoid 2 receptors protects against cerebral ischemia by inhibiting neutrophil recruitment. *FASEB Journal* **24**(3), 788-798.
- 10. Sender LY, Gibbert K, Suezter Y, Radeke HH, Kalinke U & Waibler Z (2010) CD40 ligand-triggered human dendritic cells mount interleukin-23 responses that are further enhanced by danger signals. *Molecular Immunology* **47**(6), 1255-1261.
- 11. Al Moussawi K, Ghigo E, Kalinke U, Alexopoulou L, Mege JL & Desnues B (2010) Type I interferon induction is detrimental during infection with the Whipple's disease bacterium, *Tropheryma whippelii*. *PLoS Pathogens* **6**(1): e1000722.
- 12. Ilchmann A, Burgdorf S, Scheurer S, Waibler Z, Nagai R, Wellner A, Yamamoto Y, Yamamoto H, Henle T, Kurts C, Kalinke U, Vieths S & Toda M (2010) Glycation of a food allergen by the Maillard reaction enhances its T-cell immunogenicity: role of macrophage scavenger receptor class A type I and II. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **125**(1), 175-183 e171-111.
- 13. Kern M, Popov A, Scholz K, Schumak B, Djandji D, Limmer A, Eggle D, Sacher T, Zawatzky R, Holtappels R, Reddehase MJ, Hartmann G, Debey-Pascher S, Diehl L, Kalinke U, Koszinowski U, Schultze J & Knolle PA (2010) Virally infected mouse liver endothelial cells trigger CD8+ T-cell immunity. *Gastroenterology* **138**(1), 336-346.
- 14. Malinarich FH, Grabski E, Worbs T, Chennupati V, Haas JD, Schmitz S, Candia E, Quera R, Malissen B, Förster R, Hermoso M & Prinz I (2010) Constant TCR triggering suggests that the TCR expressed on intestinal intraepithelial $\gamma\delta$ T cells is functional *in vivo*. *European Journal of Immunology* **40**(12), 3378-88.
- 15. Schneider CK, Salmikangas P, Jilma B, Flamion B, Todorova LR, Paphitou A, Hauneroova I, Maimets T, Trouvin JH, Flory E, Tsiftoglou A, Sarkadi B, Gudmundsson K, O'Donovan M, Migliaccio G, Ancans J, Maciulaitis R, Robert JL, Samuel A, Ovelgonne JH, Hystad M, Fal AM, Lima BS, Moraru AS, Turcani P, Zorec R, Ruiz S, Akerblom L, Narayanan G, Kent A, Bignami F, Dickson JG, Niederwieser D, Figuerola-Santos MA, Reischl IG, Beuneu C, Georgiev R, Vassiliou M, Pychova A, Clausen M, Methuen T, Lucas S, Schussler-Lenz M, Kokkas V, Buzas Z, MacAleenan N, Galli MC, Line A, Gulbinovic J, Berchem G, Fraczek M, Menezes-Ferreira M, Vilceanu N, Hrubisko M, Marinko P, Timon M, Cheng W, Crosbie GA, Meade N, di Paola ML, VandenDriessche T, Ljungman P, D'Apote L, Oliver-Diaz O, Buttler I & Celis P (2010) Challenges with advanced therapy medicinal products and how to meet them. *Nature Reviews Drug Discovery* **9**(3), 195-201. Review.
- 16. Buttler IC, Voller K & Schneider CK (2010) Immunogenicity and its impact on benefit/risk considerations in the authorisation of biopharmaceuticals. *Current Drug Safety* **5**(4), 287-292. Review.
- 17. Goetz KB, Pfeleiderer M & Schneider CK (2010) First-in-human clinical trials with vaccines-what regulators want. *Nature Biotechnology* **28**(9), 910-916. Review.
- 18. Schussler-Lenz M & Schneider CK (2010) [Clinical trials with advanced therapy medicinal products]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* **53**(1), 68-74. Review.

Forschungsgruppe um Prof. Pietschmann

- 1. Frentzen A, Hüging K, Bitzegeio J, Friesland M, Haid S, Gentzsch J, Hoffmann M, Lindemann D, Zimmer G, Zielecki F, Weber F, Steinmann E & Pietschmann T (2011) Completion of hepatitis C virus replication cycle in heterokaryons excludes dominant restrictions in human non-liver and mouse liver cell lines. *PLoS Pathog* (in press).
- 2. Gentzsch J, Hinkelmann B, Kaderali L, Irschik H, Jansen R, Sasse F, Frank R & Pietschmann T (2011) Hepatitis C virus complete life cycle screen for identification of small molecules with pro- or antiviral activity. *Antiviral Research* **89**(2), 136-48. Epub 2010 Dec 15.
- 3. Montserret R, Saint N, Vanbelle C, Salvay AG, Simorre JP, Ebel C, Sapay N, Renisio JG, Bockmann A, Steinmann E, Pietschmann T, Dubuisson J, Chipot C & Penin F (2010) NMR structure and ion channel activity of the p7 protein from hepatitis C virus. *Journal of Biological Chemistry* **285**(41), 31446-31461.
- 4. Steinmann E & Pietschmann T (2010) Hepatitis C virus P7 - a viroporin crucial for virus assembly and an emerging target for antiviral therapy. *Viruses* **2**(9), 2078-2095 (Review).
- 5. Bitzegeio J, Bankwitz D, Hueging K, Haid S, Brohm C, Zeisel MB, Herrmann E, Iken M, Ott M & Baumert TF, Pietschmann T (2010) Adaptation of hepatitis C virus to mouse CD81 permits infection of mouse cells in the absence of human entry factors. *PLoS Pathogens* **6**: e1000978.
- 6. Bürgel B, Friesland M, Koch A, Manns MP, Wedemeyer H, Weissenborn K, Schulz-Schaeffer WJ, Pietschmann T, Steinmann E & Ciesek S (2010) Hepatitis C virus enters human peripheral neuroblastoma cells - evidence for extra-hepatic cells sustaining hepatitis C virus penetration. *Journal of Viral Hepatology* Jun 23 [Epub ahead of print].

- 7. Ciesek S, Friesland M, Steinmann J, Becker B, Wedemeyer H, Manns MP, Pietschmann T & Steinmann E (2010) How stable is the hepatitis C virus (HCV)? Environmental stability of HCV and its susceptibility to chemical biocides. *Journal of Infectious Diseases* **201**(12), 1859-1866.
- 8. Lemon SM, McKeating JA, Pietschmann T, Frick DN, Glenn JS, Tellinghuisen TL, Symons J & Furman PA (2010) Development of novel therapies for hepatitis C. *Antiviral Research* **86**(1), 79-92 (Review).
- 9. Bankwitz D, Steinmann E, Bitzegeio J, Ciesek S, Friesland M, Herrmann E, Zeisel MB, Baumert TF, Keck ZY, Foung SK, Pecheur EI & Pietschmann T (2010) Hepatitis C virus hypervariable region 1 modulates receptor interactions, conceals the CD81 binding site, and protects conserved neutralizing epitopes. *Journal of Virology* **84**(11), 5751-5763.
- 10. Stegmann KA, Bjorkstrom NK, Veber H, Ciesek S, Riese P, Wiegand J, Hadem J, Suneetha PV, Jaroszewicz J, Wang C, Schlaphoff V, Fytili P, Cornberg M, Manns MP, Geffers R, Pietschmann T, Guzman CA, Ljunggren HG & Wedemeyer H (2010) Interferon-alpha-induced TRAIL on natural killer cells is associated with control of hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* **138**(5), 1885-1897.
- 11. Ciesek S, Steinmann E, Iken M, Ott M, Helfritz FA, Wappler I, Manns MP, Wedemeyer H & Pietschmann T (2010) Glucocorticosteroids increase cell entry by hepatitis C virus. *Gastroenterology* **138**(5), 1875-1884.
- 12. von Hahn T, Steinmann E, Ciesek S & Pietschmann T (2010) Know your enemy: translating insights about the molecular biology of hepatitis C virus into novel therapeutic approaches. *Expert Review on Gastroenterology & Hepatology* **4**(1), 63-79.
- 13. Steinmann J, Becker B, Bischoff B, Paulmann D, Friesland M, Pietschmann T, Steinmann E (2010) Virucidal activity of 2 alcohol-based formulations proposed as hand rubs by the World Health Organization. *American Journal of Infection Control* **38**(1), 66-68.
- 14. Haid S, Windisch MP, Bartenschlager R & Pietschmann T (2010) Mouse-specific residues of claudin-1 limit hepatitis C virus genotype 2a infection in a human hepatocyte cell line. *Journal of Virology* **84**(2), 964-975.
- 6. Stagg J, Divisekera U, Duret H, Sparwasser T, Teng MW, Darcy PK & Smyth MJ (2011) CD73-deficient mice have increased anti-tumor immunity and are resistant to experimental metastasis. *Cancer Research* Feb 3 [Epub ahead of print].
- 7. Ohnmacht C*, Marques R*, Presley L*, Sawa S*, Lochner M* & Eberl G (2011) Intestinal microbiota, evolution of the immune system and the bad reputation of pro-inflammatory immunity. *Cellular Microbiology* Jan 28 [Epub ahead of print] Review.
- 8. Mayer CT, Floess S, Baru AM, Lahl K, Huehn J & Sparwasser T (2011) CD8+Foxp3+ T cells share developmental and phenotypic features with classical CD4+Foxp3+ regulatory T cells but lack potent suppressive activity. *European Journal of Immunology* **41**(3), 716-725.
- 9. Lahl K & Sparwasser T (2011) *In vivo* depletion of Foxp3+ Tregs using the DEREK mouse model. *Methods in Molecular Biology* **707**, 157-172 Review.
- 10. Berod L, Heinemann C, Heink S, Escher A, Stadelmann C, Drube S, Wetzker R, Norgauer J & Kamradt T (2011) PI3K deficiency delays the onset of experimental autoimmune encephalomyelitis and ameliorates its clinical outcome. *European Journal of Immunology* **41**(3), 833-844.
- 11. Pellegrini M, Calzascia T, Toe JG, Preston SP, Lin AE, Elford AR, Shahinian A, Lang PA, Lang KS, Morre M, Assouline B, Lahl K, Sparwasser T, Tedder TF, Paik J, DePinho RA, Basta S, Ohashi PS & Mak TW (2011) IL-7 engages multiple mechanisms to overcome chronic viral infection and limit organ pathology. *Cell* **144**(4), 601-613.
- 12. Dietze KK, Zelinskyy G, Gibbert K, Schimmer S, Francois S, Myers L, Sparwasser T, Hasenkrug KJ & Dittmer U (2011) Transient depletion of regulatory T cells in transgenic mice reactivates virus-specific CD8+ T cells and reduces chronic retroviral set points. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* **108**(6), 2420-2425.
- 13. Vaeth M, Gogishvili T, Bopp T, Klein M, Berberich-Siebelt F, Gattenloehner S, Avots A, Sparwasser T, Grebe N, Schmitt E, Hunig T, Serfling E & Bodor J (2011) Regulatory T cells facilitate the nuclear accumulation of inducible cAMP early repressor (ICER) and suppress nuclear factor of activated T cell c1 (NFATc1). *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* **108**(6), 2480-2485.

Forschungsgruppe um Prof. Sparwasser

- 1. Hackl D, Loschko J, Sparwasser T, Reindl W & Krug A (2011) Activation of dendritic cells via TLR7 reduces Foxp3 expression and suppressive function in induced Tregs. *European Journal of Immunology* (in press).
- 2. Paust HJ, Ostmann A, Erhardt A, Turner JE, Mittrücker HW, Sparwasser T, Panzer U & Tiegs G (2011) Regulatory T cells control the Th1 immune response in murine crescentic glomerulonephritis. *Kidney International* (in press).
- 3. Sawa S, Lochner M, Satoh-Takayama N, Gaboriau-Routhiau V, Dulauroy S, Bérard M, Kleinschek M, Cerf-Bensussan N, Cua D, Di Santo JP & Eberl G (2011) RORgt+ innate lymphoid cells regulate intestinal homeostasis by integrating negative signals from the symbiotic microbiota. *Nature Immunology* Feb 20 [Epub ahead of print].
- 4. Blankenhaus B, Klemm U, Eschbach ML, Sparwasser T, Huehn J, Kühl AA, Loddenkemper C, Jacobs T & Breloer M (2011) *Strongyloides ratti* infection induces expansion of Foxp3+ regulatory T cells that interfere with immune response and parasite clearance in BALB/c mice. *Journal of Immunology* Feb 18 [Epub ahead of print].
- 5. Hadis U, Wahl B, Schulz O, Schippers A, Wagner N, Müller W, Sparwasser T, Förster R & Pabst O (2011) Cooperation of lymph nodes and intestinal lamina propria in FoxP3+ regulatory T cell mediated intestinal tolerance. *Immunity* **34**(2), 237-246.
- 14. Lochner M, Bérard M, Sawa S, Hauer S, Gaboriau-Routhiau V, Fernandez F, Bouso P, Cerf-Bensussan N & Eberl G (2011) Restricted microbiota and absence of cognate TCR antigen leads to an unbalanced generation of Th17 cells. *Journal of Immunology* **186**(3), 1531-1537 (Epub 2010 Dec 22)
- 15. Lochner M, Ohnmacht C, Presley L, Bruhns P, Si-Tahar M, Sawa S & Eberl G (2011) Microbiota-induced tertiary lymphoid tissues aggravate inflammatory disease in the absence of RORgt and LTi cells. *Journal of Experimental Medicine* **208**(1), 125-134 (Epub 20 Dec 2010)
- 16. Haque A, Best SE, Amante FH, Mustafah S, Desbarrieres L, de Labastida F, Sparwasser T, Hill GR & Engwerda CR (2010) CD4+ natural regulatory T cells prevent experimental cerebral malaria via CTLA-4 when expanded *in vivo*. *PLoS Pathogens* **6**(12), e1001221.
- 17. Engel D, Koscielny A, Wehner S, Maurer J, Schiwon M, Franken L, Schumak B, Limmer A, Sparwasser T, Hirner A, Knolle P, Kalf J & Kurts C (2010) Th1 memory cells disseminate postoperative ileus over the entire intestinal tract. *Nature Medicine* **16**(12), 1407-1413.
- 18. Hubert S, Rissiek B, Klages K, Hühn J, Sparwasser T, Haag F, Koch-Nolte F, Boyer O, Seman M & Adriouch S (2010) Extracellular NAD+ shapes the Foxp3+ regulatory T cell compartment through the ART2/P2X7 pathway. *Journal of Experimental Medicine* **207**(12), 2561-2568.

- 19. Teng MW, Ngiew SF, von Scheidt B, McLaughlin N, Sparwasser T & Smyth MJ (2010) Conditional regulatory T-cell depletion releases adaptive immunity preventing carcinogenesis and suppressing established tumor growth. *Cancer Research* **70(20)**, 7800-7809.
- 20. Klages K, Mayer CT, Lahl K, Loddenkemper C, Teng MW, Ngiew SF, Smyth MJ, Hamann A, Huehn J & Sparwasser T (2010) Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells improves effective therapeutic vaccination against established melanoma. *Cancer Research* **70(20)**, 7788-7799.
- 21. Sawa S, Cherrier M, Lochner M, Satoh-Takayama N, Fehling HJ, Langa F, Di Santo JP & Eberl G (2010) Lineage relationship analysis of ROR t+ innate lymphoid cells. *Science* **330(6004)**, 665-669.
- 22. Navarro S, Cossalter G, Chiavaroli C, Kanda A, Fleury S, Lazzari A, Cazareth J, Sparwasser T, Dombrowicz D, Glaichenhaus N & Julia V (2010) The oral administration of bacterial extracts prevents asthma via the recruitment of regulatory T cells to the airways. *Mucosal Immunology* **4(1)**, 53-65 (Epub 01 Sept. 2010).
- 23. Arnold I, Lee J, Amieva M, Roers A, Flavell R, Sparwasser T & Müller A (2010) Tolerance rather than immunity protects from *Helicobacter pylori*-induced gastric preneoplasia. *Gastroenterology* **140(1)**, 199-209 (Epub 22 June 2010).
- 24. Baru AM, Hartl A, Lahl K, Krishnaswamy JK, Fehrenbach H, Yildirim A, Garn H, Renz H, Behrens G & Sparwasser T (2010) Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells during sensitization phase aggravates experimental allergic airway inflammation. *European Journal of Immunology* **40(8)**, 2259-2266.
- 25. Pechloff K, Holch J, Ferch U, Schwenecker M, Brunner K, Kremer M, Sparwasser T, Quintanilla-Martinez L, Zimmer-Strobl U, Streubel B, Gewies A, Peschel C & Ruland J (2010) The fusion kinase ITK-SYK mimics a T-cell receptor signal and drives oncogenesis in conditional mouse models of peripheral T cell lymphoma. *Journal of Experimental Medicine* **207(5)**, 1031-1044.
- 26. Suttner K, Depner M, Wetzke M, Klopp N, von Mutius E, Illig T, Sparwasser T & Kabesch M (2010) Genetic variants harbored in the forkhead box protein 3 locus increase hay fever risk. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **125(6)**, 1395-1399.
- 27. Boissonnas A, Scholer-Dahirel A, Simon-Blancal V, Pace L, Valet F, Kissenpfennig A, Sparwasser T, Malissen B, Fetler L & Amigorenga S (2010) FoxP3+ T cells induce perforin-dependent dendritic cell death in tumor-draining lymph nodes. *Immunity* **32(2)**, 266-278.
- 28. Schildknecht A, Brauer S, Brenner C, Lahl K, Schild H, Sparwasser T*, Probst HC* & van den Broek M* (2010) FoxP3+ regulatory T cells essentially contribute to peripheral CD8+ T cell tolerance induced by steady state dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* **107(1)**, 199-203 *(equally contributed) (Epub 2009).
- 29. Anz D, Koelzer VH, Moder S, Thaler R, Schwerdt T, Lahl K, Sparwasser T, Besch R, Poeck H, Hornung V, Hartmann G, Rothenfusser S, Bourquin C & Endres S (2010) Immunostimulatory RNA blocks suppression by regulatory T cells. *Journal of Immunology* **184(2)**, 939-946 (Epub 2009).
- 4. Müsken M, Di Fiore S, Römmling U & Häussler S (2010) A 96-well-plate-based optical method for the quantitative and qualitative evaluation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and its application to susceptibility testing. *Nature Protocols* **5(8)**, 1460-1469.
- 5. Häussler S & Parsek MR (2010) Biofilms 2009: new perspectives at the heart of surface-associated microbial communities. *Journal of Bacteriology* **192(12)**, 2941-2949.
- 6. Dötsch A, Klawonn F, Jarek M, Scharfe M, Blocker H & Häussler S (2010) Evolutionary conservation of essential and highly expressed genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Genomics* **11**, 234.
- 7. Müsken M, Di Fiore S, Dötsch A, Fischer R & Häussler S (2010) Genetic determinants of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm establishment. *Microbiology* **156(Pt 2)**, 431-441.

Forschungsgruppe um Prof. Ott

- 1. Sharma AD, Narain N, Händel EM, Iken M, Singhal N, Cathomen T, Manns M, Schöler HR, Ott M & Cantz T (2011) MicroRNA-221 regulates FAS-induced fulminant liver failure. *Hepatology* [Epub ahead of print].
 - 2. Sharma AD, Razvan I, Bock M, Cantz T, Manns MP & Ott M (2011) Liver (chapter 33); G. Steinhoff (ed.) Regenerative Medicine: From protocol to patient, pp. 773-803.
 - 3. Razvan I, Rüdrieh U, Rothe M, Kirsch S, Maasoumy B, Narain N, Verfaillied CM, Sancho-Bru P, Iken M, Popescu I, Schambach A, Manns MP & Bock M (2011) Induction of a mature hepatocyte phenotype in adult liver derived progenitor cells by ectopic expression of transcription factors. *Stem Cell Research* Feb 24 [Epub ahead of print].
 - 4. Becker PD, Legrand N, van Geelen CM, Noerder M, Huntington ND, Lim A, Yasuda E, Diehl SA, Scheeren FA, Ott M, Weijer K, Wedemeyer H, Di Santo JP, Beaumont T, Guzman CA & Spits H (2010) Generation of human antigen-specific monoclonal IgM antibodies using vaccinated "human immune system" mice. *PLoS One* **5(10)**.
 - 5. Sancho-Bru P, Roelandt P, Narain N, Pauwelyn K, Notelaers T, Shimizu T, Ott M & Verfaillie C (2010) Directed differentiation of murine-induced pluripotent stem cells to functional hepatocyte-like cells. *Journal of Hepatology* **54(1)**, 98-107.
 - 6. Asgari S, Pournasr B, Salekdeh GH, Ghodsizadeh A, Ott M & Baharvand H (2010) Induced pluripotent stem cells: a new era for hepatology. *Journal of Hepatology* **53(4)**, 738-751.
 - 7. Bitzegeio J, Bankwitz D, Hueging K, Haid S, Brohm C, Zeisel MB, Herrmann E, Iken M, Ott M, Baumert TF & Pietschmann T (2010) Adaptation of hepatitis C virus to mouse CD81 permits infection of mouse cells in the absence of human entry factors. *PLoS Pathogens* **6**, e1000978.
 - 8. Ciesek S, Steinmann E, Iken M, Ott M, Helfritz FA, Wappeler I, Manns MP, Wedemeyer H & Pietschmann T (2010) Glucocorticosteroids increase cell entry by hepatitis C virus. *Gastroenterology* **138(5)**, 1875-1884.
 - 9. Hettwer M, Reis-Fernandes MA, Iken M, Ott M, Steinberg P & Nau H (2010) Metabolic activation capacity by primary hepatocytes expands the applicability of the embryonic stem cell test as alternative to experimental animal testing. *Reproductive Toxicology* **30(1)**, 113-120.
 - 10. Stange MA, Tutarel O, Pischke S, Schneider A, Strassburg CP, Becker T, Barg-Hock H, Basturk M, Wursthorn K, Cornberg M, Ott M, Greten TF, Manns MP & Wedemeyer H (2010) Fulminant hepatic failure due to chemotherapy-induced hepatitis B reactivation: role of rituximab. *Zeitschrift für Gastroenterologie* **48(2)**, 258-263.
- Forschungsgruppe um Prof. Häußler**
- 1. Schmidt J, Müsken M, Becker T, Magnowska Z, Bertinetti D, Möller S, Zimmermann B, Herberg FW, Jänsch L & Häussler S (2011). The *Pseudomonas aeruginosa* chemotaxis methyltransferase CheR1 impacts on bacterial surface sampling. *PLoS One* (in press).
 - 2. Häussler S (2010) Multicellular signalling and growth of *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Medical Microbiology* **300(8)**, 544-548.
 - 3. Pommerenke C, Müsken M, Becker T, Dötsch A, Klawonn F & Häussler S (2010) Global genotype-phenotype correlations in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathogens* **6(8)**. pii: e1001074.

Veröffentlichungen 2010-2011

Abt. für Molekulare Infektionsbiologie | Prof. Dr. Petra Dersch

- Driouch, H., Roth, A., Dersch, P., & Wittmann, C. (2010) Filamentous fungi in good shape: Microparticles for tailor-made fungal morphology and enhanced enzyme production. *Bioengineered Bugs* **2**.
- Driouch, H., Roth, A., Dersch, P., & Wittmann, C. (2010) Optimized bio-process for production of fructofuranosidase by recombinant *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **87**, 2011-2024.
- Fleissner, A. & Dersch, P. (2010) Expression and export: recombinant protein production systems for *Aspergillus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **87**, 1255-1270.
- Göpel, Y., Luttmann, D., Heroven, A.K., Reichenbach, B., Dersch, P., & Görke, B. (2010) Common and divergent features in transcriptional control of the homologous small RNAs GlmY and GlmZ in *Enterobacteriaceae*. *Nucleic Acids Research* **39**, 1294-1309.
- Heroven, A.K. & Dersch, P. (2010) Global virulence gene regulation networks in enteropathogenic *Yersinia*. In: Research Advances in Molecular Microbiology (Mohan, R.M., ed.), Global Research Network, Kerala, Indien, pp. 1-17.
- Homann, A., Qamar, R.-U., Serim, S., Dersch, P., & Seibel, J. (2010) Bioorthogonal metabolic glycoengineering of human larynx carcinoma (HEp-2) cells targeting sialic acid. *Beilstein Journal of Organic Chemistry* **6**.
- Quade, N., Dieckmann, M., Haffke, M., Heroven, A.K., Dersch, P., & Heinz, D.W.*. (2011) Structure of the effector-binding domain of the LysR-type transcription factor RovM from *Yersinia pseudotuberculosis*. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **67**, 81-90.
- Dersch, P. & Jahn, D. (2011) Mikrobielle Genetik. In Mikrobiologie (Munk, K., ed.), Thieme, in press

AG Chronische Pseudomonas Infektionen | Prof. Dr. Susanne Häußler

- Dötsch, A., Klawonn, F., Jarek, M., Scharfe, M., Blöcker, H., & Häußler, S. (2010) Evolutionary conservation of essential and highly expressed genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC GENOMICS* **11**, 234.
- Häußler, S. (2010) Multicellular signalling and growth of *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Medical Microbiology* **300**, 544-548.
- Häußler, S. & Parsek, M.R. (2010) Biofilms 2009: new perspectives at the heart of surface-associated microbial communities. *Journal of Bacteriology* **192**, 2941-2949.
- Häußler, S. (2010) Multicellular signalling and growth of *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Medical Microbiology* **300**, 544-548.
- Moreno, A.M., Matz, C., Kjelleberg, S., & Manefield, M. (2010) Identification of ciliate grazers of autotrophic bacteria in ammonia-oxidizing activated sludge by RNA stable isotope probing. *Applied and Environmental Microbiology* **76**, 2203-2211.
- Müsken, M., Di, F.S., Dötsch, A., Fischer, R., & Häußler, S. (2010) Genetic determinants of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm establishment. *Microbiology* **156**, 431-441.
- Müsken, M., Di, F.S., Römling, U., & Häußler, S. (2010) A 96-well-plate-based optical method for the quantitative and qualitative evaluation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and its application to susceptibility testing. *Nature Protocols* **5**, 1460-1469.
- Pommerenke, C., Müsken, M., Becker, T., Dötsch, A., Klawonn, F., & Häußler, S. (2010) Global genotype-phenotype correlations in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathogens* **6**, 89-90.
- Haddad, A., Jensen, V., Becker, T., & Häußler, S. (2011) The Pho regulon influences biofilm formation and type three secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology Reports* **1**, 488-494.
- Schmidt, J., Müsken, M., Becker, T., Magnowska, Z., Bertinetti, D., Moller, S., Zimmermann, B., Herberg, F.W., Jansch, L., & Häußler, S. (2011) The *Pseudomonas aeruginosa* chemotaxis methyltransferase CheR1 impacts on bacterial surface sampling. *PLoS ONE* **6**, e18184.

AG Mikrobielle Kommunikation | Prof. Dr. Irene Wagner-Döbler

- Kunze, B., Reck, M., Dötsch, A., Lemme, A., Schummer, D., Irschik, H., Steinmetz, H., & Wagner-Döbler, I. (2010) Damage of *Streptococcus mutans* biofilms by carolacton, a secondary metabolite from the myxobacterium *Sorangium cellulosum*. *BMC Microbiology* **10**, 199.
- Lemme, A., Sztajer, H., & Wagner-Döbler, I. (2010) Characterization of mleR, a positive regulator of malolactic fermentation and part of the acid tolerance response in *Streptococcus mutans*. *BMC Microbiology* **10**, 58.
- Nawrath, T., Dickschat, J.S., Kunze, B., & Schulz, S. (2010) The biosynthesis of branched dialkylpyrazines in myxobacteria. *Chemistry and Biodiversity* **7**, 2129-2144.
- Riedel, T., Tomasch, J., Buchholz, I., Jacobs, J., Kollenberg, M., Gerdt, G., Wichels, A., Brinkhoff, T., Cypionka, H., & Wagner-Döbler, I. (2010) Constitutive expression of the proteorhodopsin gene by a flavobacterium strain representative of the proteorhodopsin-producing microbial community in the North Sea. *Applied in Environmental Microbiology* **76**, 3187-3197.
- Schulz, S., Dickschat, J.S., Kunze, B., Wagner-Döbler, I., Diestel, R., & Sasse, F. (2010) Biological activity of volatiles from marine and terrestrial bacteria. *Marine Drugs* **8**, 2976-2987.
- Thiel, V., Brinkhoff, T., Dickschat, J.S., Wickel, S., Grunenberg, J., Wagner-Döbler, I., Simon, M., & Schulz, S. (2010) Identification and biosynthesis of tropone derivatives and sulfur volatiles produced by bacteria of the marine *Roseobacter* clade. *Organic and Biomolecular Chemistry* **8**, 234-246.
- Vilchez, R., Lemme, A., Ballhausen, B., Thiel, V., Schulz, S., Jansen, R., Sztajer, H., & Wagner-Döbler, I. (2010) *Streptococcus mutans* inhibits *Candida albicans* hyphal formation by the fatty acid signaling molecule trans-2-decenoic acid (SDSF). *ChemBioChem* **11**, 1552-1562.
- Wagner-Döbler, I., Ballhausen, B., Berger, M., Brinkhoff, T., Buchholz, I., Bunk, B., Cypionka, H., Daniel, R., Drepper, T., Gerdt, G., Hahnke, S., Han, C., Jahn, D., Kalhoefer, D., Kiss, H., Klenk, H.P., Kyrpides, N., Liebl, W., Liesegang, H., Meincke, L., Pati, A., Petersen, J., Piekarski, T., Pommerenke, C., Pradella, S., Pukall, R., Rabus, R., Stackebrandt, E., Thole, S., Thompson, L., Tielen, P., Tomasch, J., von, J.M., Wanphrut, N., Wichels, A., Zech, H., & Simon, M. (2010) The complete genome sequence of the algal symbiont *Dinoroseobacter shibae*: a hitchhiker's guide to life in the sea. *ISME Journal* **4**, 61-77.

- Xue, X., Tomasch, J., Sztajer, H., & Wagner-Döbler, I. (2010) The delta subunit of RNA polymerase, RpoE, is a global modulator of *Streptococcus mutans* environmental adaptation. *Journal of Bacteriology* **192**, 5081-5092.
 - Leonhäuser, J., Wang, W., Deckwer, W.-D., & Wagner-Döbler, I. (2011) Functioning of the mercury resistance operon at extremely high Hg(II) loads in a chemostat: a proteome analysis. *Journal of Biotechnology*, in press
- Abt. für Genregulation und Differenzierung | Prof. Dr. Hansjörg Hauser**
- Badar, M., Hemmen, K., Nimtz, M., Stieve, M., Stiesch, M., Lenarz, T., Hauser, H., Möllmann, U., Vogt, S., Schnabelrauch, M., & Müller, P.P.*. (2010) Evaluation of madurahydroxylactone as a slow release antibacterial implant coating. *Open Biomedical Engineering Journal* **4**, 263-270.
 - Becker, J., Pavlakovic, H., Ludewig, F., Wilting, F., Weich, H.A.*., Albuquerque, R., Ambati, J., & Wilting, J. (2010) Neuroblastoma progression correlates with downregulation of the lymphangiogenesis inhibitor sVEGFR-2. *Clinical Cancer Research* **16**, 1431-1441.
 - Bergmann, A., Ahmad, S., Cudmore, M., Gruber, A.D., Wittschen, P., Lindenmaier, W., Christofori, G., Gross, V., Gonzalves, A.C., Grone, H.J., Ahmed, A., & Weich, H.A.*. (2010) Reduction of circulating soluble Flt-1 alleviates preeclampsia-like symptoms in a mouse model. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **14**, 1857-1867.
 - Charbord, P., Livne, E., Gross, G., Haupl, T., Neves, N.M., Marie, P., Bianco, P., & Jorgensen, C. (2010) Human bone marrow mesenchymal stem cells: a systematic reappraisal via the genostem experience. *Stem Cell Reviews and Reports* **7**, 32-42.
 - Cohen-Haguenaer, O., Creff, N., Cruz, P., Tunc, C., Aiuti, A., Baum, C., Bosch, F., Blomberg, P., Cichutek, K., Collins, M., Danos, O., Dehaut, F., Federspiel, M., Galun, E., Garritsen, H., Hauser, H., Hildebrandt, M., Klatzmann, D., Merten, O.W., Montini, E., O'Brien, T., Panet, A., Rasooly, L., Scherman, D., Schmidt, M., Schweitzer, M., Tiberghien, P., Vandendriessche, T., Ziehr, H., Yla-Herttuala, S., von, K.C., Gahrton, G., & Carrondo, M. (2010) Relevance of an academic GMP Pan-European vector infra-structure (PEVI). *Current Gene Therapy* **10**, 414-422.
 - Coroadinha, A.S., Gama-Norton, L., Amaral, A.I., Hauser, H., Alves, P.M., & Cruz, P.E. (2010) Production of retroviral vectors: review. *Current Gene Therapy* **10**, 456-473.
 - Courties, G., Seiffart, V., Presumey, J., Escriou, V., Scherman, D., Zwerina, J., Ruiz, G., Zietara, N., Jablonska, J., Weiss, S., Hoffmann, A., Jorgensen, C., Apparailly, F., & Gross, G. (2010) *In vivo* RNAi-mediated silencing of TAK1 decreases inflammatory Th1 and Th17 cells through targeting of myeloid cells. *Blood* **116**, 3505-3516.
 - Dietrich, N., Rohde, M., Geffers, R., Kroger, A., Hauser, H., Weiss, S., & Gekara, N.O. (2010) Mast cells elicit proinflammatory but not type I interferon responses upon activation of TLRs by bacteria. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 8748-8753.
 - Dittmar, K.E.*., Simann, M., Zghoul, N., Schön, O., Meyring, W., Hannig, H., Macke, L., Dirks, W.G., Miller, K., Garritsen, H.S.P., & Lindenmaier, W. (2010) Quality of cell products: Authenticity, identity, genomic stability and status of differentiation. *Transfusion Medicine and Hemotherapy* **37**, 57-64.
 - Ehlert, N., Hoffmann, A., Luessenhop, T., Gross, G., Mueller, P.P.*., Stieve, M., Lenarz, T., & Behrens, P. (2010) Amino-modified silica surfaces efficiently immobilize bone morphogenetic protein 2 (BMP2) for medical purposes. *Acta Biomaterialia* **7**, 1772-1779.
 - Ehlert, N., Müller, P.P.*., Stieve, M., & Behrens, P. (2010) Immobilization of alkaline phosphatase on modified silica coatings. *Microporous and Mesoporous Materials* **131**, 51-57.
 - Gama-Norton, L., Herrmann, S., Schucht, R., Coroadinha, A.S., Low, R., Alves, P.M., Bartholomae, C.C., Schmidt, M., Baum, C., Schambach, A., Hauser, H., & Wirth, D. (2010) Retroviral vector performance in defined chromosomal loci of modular packaging cell lines. *Human Gene Therapy* **21**, 979-991.
 - Garritsen, H.S., Macke, L., Meyring, W., Hannig, H., Pagelow, U., Wormann, B., Geffers, R., Dittmar, K.E.*., & Lindenmaier, W. (2010) Efficient generation of clinical-grade genetically modified dendritic cells for presentation of multiple tumor-associated proteins. *Transfusion* **50**, 831-842.
 - Kirschning, C.J., Dreher, S., Maass, B., Fichte, S., Schade, J., Koster, M., Noack, A., Lindenmaier, W., Wagner, H., & Boldicke, T. (2010) Generation of anti-TLR2 intrabody mediating inhibition of macrophage surface TLR2 expression and TLR2-driven cell activation. *BMC Biotechnology* **10**, 31.
 - Loew, R., Meyer, Y., Kuehlcke, K., Gama-Norton, L., Wirth, D., Hauser, H., Stein, S., Grez, M., Thornhill, S., Thrasher, A., Baum, C., & Schambach, A. (2010) A new PG13-based packaging cell line for stable production of clinical-grade self-inactivating gamma-retroviral vectors using targeted integration. *Gene Therapy* **17**, 272-280.
 - Macke, L., Garritsen, H.S., Meyring, W., Hannig, H., Pagelow, U., Wormann, B., Piechaczek, C., Geffers, R., Rohde, M., Lindenmaier, W., & Dittmar, K.E.*. (2010) Evaluating maturation and genetic modification of human dendritic cells in a new polyolefin cell culture bag system. *Transfusion* **50**, 843-855.
 - May, T., Butueva, M., Bantner, S., Markusic, D., Seppen, J., MacLeod, R.A., Weich, H., Hauser, H., & Wirth, D. (2010) Synthetic gene regulation circuits for control of cell expansion. *Tissue Engineering - Part A* **16**, 441-452.
 - Nehlsen, K., Herrmann, S., Zauers, J., Hauser, H., & Wirth, D. (2010) Toxin-antitoxin based transgene expression in mammalian cells. *Nucleic Acids Research* **38**, e32.
 - Pulverer, J.E., Rand, U., Lienenklaus, S., Kugel, D., Zietara, N., Kochs, G., Naumann, R., Weiss, S., Staeheli, P., Hauser, H., & Koster, M. (2010) Temporal and spatial resolution of type I and III interferon responses *in vivo*. *Journal of Virology* **84**, 8626-8638.
 - Roming, M., Lünsdorf, H., Dittmar, K.E.*., & Feldmann, C. (2010) ZrO(HP0(4))(1-x)(FMN)(x): quick and easy synthesis of a nanoscale luminescent biomarker. *Angewandte Chemie International Edition* **49**, 632-637.
 - Sandhu, U., Cebula, M., Behme, S., Riemer, P., Wodarczyk, C., Metzger, D., Reimann, J., Schirmbeck, R., Hauser, H., & Wirth, D. (2010) Strict control of transgene expression in a mouse model for sensitive biological applications based on RMCE compatible ES cells. *Nucleic Acids Research* **39**, e1.
 - Schniederhann, J., Rennecke, M., Buttler, K., Richter, G., Stadler, A.M., Norgall, S., Badar, M., Barleon, B., May, T., Wilting, J., & Weich, H.A.*. (2010) Mouse lung contains endothelial progenitors with high capacity to form blood and lymphatic vessels. *BMC Cell Biology* **11**, 50.
 - Schucht, R., Wirth, D., & May, T. (2010) Precise regulation of transgene expression level and control of cell physiology. *Cell Biology and Toxicology* **26**, 29-42.
 - Shahab-Osterloh, S., Witte, F., Hoffmann, A., Winkel, A., Laggies, S., Neumann, B., Seiffart, V., Lindenmaier, W., Gruber, A.D., Ringe, J., Haupl, T., Thorey, F., Willbold, E., Corbeau, P., & Gross, G. (2010) Mesenchymal stem cell-dependent formation of heterotopic tendon-bone insertions (osteotendinous junctions). *Stem Cells* **28**, 1590-1601.
 - Stammen, S., Schuller, F., Dietrich, S., Gamer, M., Biedendieck, R., & Jahn, D. (2010) Application of Escherichia coli phage K1E DNA-dependent RNA polymerase for *in vitro* RNA synthesis and *in vivo* protein production in *Bacillus megaterium*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **88**, 529-539.
 - Stirnweiss, A., Ksienzyk, A., Klages, K., Rand, U., Grashoff, M., Hauser, H., & Kröger, A. (2010) IFN regulatory factor-1 bypasses IFN-mediated antiviral effects through viperin gene induction. *Journal of Immunology* **184**, 5179-5185.

- Sun,L., Hemgard,G.V., Susanto,S.A., & Wirth,M. (2010) Caveolin-1 influences human influenza A virus (H1N1) multiplication in cell culture. *Virology Journal* **7**, 108.
- Thorey,F., Menzel,H., Lorenz,C., Gross,G., Hoffmann,A., & Windhagen,H. (2010) Enhancement of endoprosthesis anchoring using BMP-2. *Technology and Health Care* **18**, 217-229.
- Wirth,D., Gama-Norton,L., Schucht,R., Nehlsen,K., & Hauser,H. (2010) Site-directed engineering of defined chromosomal sites for recombinant protein and virus expression. *BioPharm International* **22**, 32-39.
- Buttler,K., Schniedermmann,J., Weich,H.A.*., & Wiltling,J. (2011) Isolierung bipotenter endothelialer Vorläuferzellen aus der Lunge adulter Mäuse [Isolation of bipotent endothelial precursor cells from lungs of adult mice]. *Lymphologie in Forschung und Praxis* **14**, 58-64.
- Carrondo,M., Panet,M., Wirth,D., Coroadinha,A.S., Cruz,P., Falk,H., Schucht,R., Dupont,F., Geny-Fiamma,C., Merten,O.W., & Hauser,H. (2011) Integrated strategy for the production of therapeutic retroviral vectors. *Human Gene Therapy* **22**, 370-379.
- Ehlert,N., Badar,M., Christel,A., Lohmeier,S.J., Luessenhop,T., Stieve,M., Lenarz,T., Müller,P.P.*., & Behrens,P. (2011) Mesoporous silica coatings for controlled release of the antibiotic ciprofloxacin from implants. *Journal of Materials Chemistry* **21**, 752-760.
- Kugel,D., Pulverer,J.E., Koster,M., Hauser,H., & Staeheli,P. (2011) Novel nonviral bioassays for mouse type I and type III interferon. *Journal of Interferone and Cytokine Research* **31**, 345-349.
- Lindenmaier,W., Lachmann,K., Meyring,W., Garritsen,H.S.P., Thomas,M., & Dittmar,K.J.*. (2011) Innenbeschichtung von Beuteln für die Kultur adhärenter humaner Zellen. *Biospektrum* **17**, 32-34.
- Lohmeyer,J.A., Liu,F., Kruger,S., Lindenmaier,W., Siemers,F., & Machens,H.G. (2011) Use of gene-modified keratinocytes and fibroblasts to enhance regeneration in a full skin defect. *Langenbeck's Archives of Surgery*.
- Lorenz,C., Hoffmann,A., Gross,G., Windhagen,H., Dellinger,P., Mohwald,K., Dempwolf,W., & Menzel,H. (2011) Coating of titanium implant materials with thin polymeric films for binding the signaling protein BMP2. *Macromolecular Bioscience* **11**, 234-244.
- Lyszkiewicz,M., Zietara,N., Rohde,M., Gekara,N.O., Jablonska,J., Dittmar,K.E.*., & Weiss,S. (2011) SIGN-R1+MHC II+ cells of the splenic marginal zone—a novel type of resident dendritic cells. *Journal of Leukocyte Biology* **89**, 607-615.
- Thorey,F., Menzel,H., Lorenz,C., Gross,G., Hoffmann,A., & Windhagen,H. (2011) Osseointegration by bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor beta2 coated titanium implants in femora of New Zealand white rabbits. *Indian Journal of Orthopaedics* **45**, 57-62.
- Düber,S. & Weiss,S. (2010) Inducible B cell development. *G. I. T. Laboratory Journal Europe* **7-8**, 28-29.
- Gekara,N.O., Zietara,N., Geffers,R., & Weiss,S. (2010) *Listeria monocytogenes* induces T cell receptor unresponsiveness through pore-forming toxin listeriolysin O. *Journal of Infectious Diseases* **202**, 1698-1707.
- Jablonska,J., Leschner,S., Westphal,K., Lienenklaus,S., & Weiss,S. (2010) Neutrophils responsive to endogenous IFN-beta regulate tumor angiogenesis and growth in a mouse tumor model. *Journal of Clinical Investigation* **120**, 1151-1164.
- Jellusova,J., Duber,S., Guckel,E., Binder,C.J., Weiss,S., Voll,R., & Nitschke,L. (2010) Siglec-G regulates B1 cell survival and selection. *Journal of Immunology* **185**, 3277-3284.
- Leschner,S. & Weiss,S. (2010) Salmonella-allies in the fight against cancer. *Journal of Molecular Medicine* **88**, 763-773.
- Leschner,S., Wolf,K., & Weiss,S. (2010) Bakterielle Infektion auf Rezept. *labor&more* **5**, 14-17.
- Leschner,S. & Weiss,S. (2010) Bacteria - fighters against cancer. *G. I. T. Laboratory Journal Europe* **9**, 20-21.
- Prajeeth,C.K., Jirmo,A.C., Krishnaswamy,J.K., Ebensen,T., Guzmán,C.A.*., Weiss,S., Constabel,H., Schmidt,R.E., & Behrens,G.M. (2010) The synthetic TLR2 agonist BPPcysMPEG leads to efficient cross-priming against co-administered and linked antigens. *European Journal of Immunology* **40**, 1272-1283.
- Pulverer,J.E., Rand,U., Lienenklaus,S., Kugel,D., Zietara,N., Kochs,G., Naumann,R., Weiss,S., Staeheli,P., Hauser,H., & Koster,M. (2010) Temporal and spatial resolution of type I and III interferon responses *in vivo*. *Journal of Virology* **84**, 8626-8638.
- Steidle,S., Martinez-Sobrido,L., Mordstein,M., Lienenklaus,S., Garcia-Sastre,A., Staeheli,P., & Kochs,G. (2010) Glycine 184 in nonstructural protein NS1 determines the virulence of influenza A virus strain PR8 without affecting the host interferon response. *Journal of Virology* **84**, 12761-12770.
- Lyszkiewicz,M., Zietara,N., Rohde,M., Gekara,N.O., Jablonska,J., Dittmar,K.E.*., & Weiss,S. (2011) SIGN-R1+MHC II+ cells of the splenic marginal zone—a novel type of resident dendritic cells. *Journal of Leukocyte Biology* **89**, 607-615.
- Crull,K., Bumann,D., & Weiss,S. (2011) Influence of infection route and virulence factors on colonization of solid tumors by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, in press
- Solodova,E., Jablonska,J., Weiss,S., & Lienenklaus,S. (2011) Production of IFN-beta *Listeria monocytogenes* infection is restricted to the monocyte/macrophage lineage. *PLOS ONE*, in press

AG Molekulare Immunologie | Dr. Siegfried Weiss

- Courties,G., Seiffart,V., Presumey,J., Escriou,V., Scherman,D., Zwerina,J., Ruiz,G., Zietara,N., Jablonska,J., Weiss,S., Hoffmann,A., Jorgensen,C., Apparailly,F., & Gross,G. (2010) *In vivo* RNAi-mediated silencing of TAK1 decreases inflammatory Th1 and Th17 cells through targeting of myeloid cells. *Blood* **116**, 3505-3516.
- Dietrich,N., Rohde,M., Geffers,R., Kröger,A., Hauser,H., Weiss,S., & Gekara,N.O. (2010) Mast cells elicit proinflammatory but not type I interferon responses upon activation of TLRs by bacteria. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 8748-8753.
- Dietrich,N., Lienenklaus,S., Weiss,S., & Gekara,N. (2010) Murine toll-like receptor 2 activation induces type I interferon responses from endolysosomal compartments. *PLOS ONE* **5**, e10250.
- Dolowschiak,T., Chassin,C., Ben,M.S., Fuchs,T.M., Weiss,S., Vandewalle,A., & Hornef,M.W. (2010) Potentiation of epithelial innate host responses by intercellular communication. *PLOS Pathogens* **6**, e1001194.

AG Modellsysteme für Infektion und Immunität | Dr. Dagmar Wirth

- Gama-Norton,L., Herrmann,S., Schucht,R., Coroadinha,A.S., Low,R., Alves,P.M., Bartholomae,C.C., Schmidt,M., Baum,C., Schambach,A., Hauser,H., & Wirth,D. (2010) Retroviral vector performance in defined chromosomal loci of modular packaging cell lines. *Human gene therapy* **21**, 979-991.
- Loew,R., Meyer,Y., Kuehlcke,K., Gama-Norton,L., Wirth,D., Hauser,H., Stein,S., Grez,M., Thornhill,S., Thrasher,A., Baum,C., & Schambach,A. (2010) A new PG13-based packaging cell line for stable production of clinical-grade self-inactivating gamma-retroviral vectors using targeted integration. *Gene Therapy* **17**, 272-280.
- May,T., Butueva,M., Bantner,S., Markusic,D., Seppen,J., MacLeod,R.A., Weich,H., Hauser,H., & Wirth,D. (2010) Synthetic gene regulation circuits for control of cell expansion. *Tissue Engineering - Part A* **16**, 441-452.

- Nehlsen,K., Herrmann,S., Zauers,J., Hauser,H., & Wirth,D. (2010) Toxin-antitoxin based transgene expression in mammalian cells. *Nucleic Acids Research* **38**, e32.
 - Sandhu,U., Cebula,M., Behme,S., Riemer,P., Wodarczyk,C., Metzger,D., Reimann,J., Schirmbeck,R., Hauser,H., & Wirth,D. (2010) Strict control of transgene expression in a mouse model for sensitive biological applications based on RMCE compatible ES cells. *Nucleic Acids Research* **39**, e1.
 - Schucht,R., Wirth,D., & May,T. (2010) Precise regulation of transgene expression level and control of cell physiology. *Cell Biology and Toxicology* **26**, 29-42.
 - Wirth,D., Gama-Norton,L., Schucht,R., Nehlsen,K., & Hauser,H. (2010) Site-directed engineering of defined chromosomal sites for recombinant protein and virus expression. *BioPharm International* **22**, 32-39.
 - Carrondo,M., Panet,M., Wirth,D., Coroadinha,A.S., Cruz,P., Falk,H., Schucht,R., Dupont,F., Geny-Fiamma,C., Merten,O.W., & Hauser,H. (2011) Integrated strategy for the production of therapeutic retroviral vectors. *Human Gene Therapy* **22**, 370-379.
- NG Chronische Infektionen und Krebs | Prof. Dr. Lars Zender**
- Gurlevik,E., Woller,N., Struver,N., Schache,P., Kloos,A., Manns,M.P., Zender,L., Kühnel,F., & Kubicka,S. (2010) Selectivity of oncolytic viral replication prevents antiviral immune response and toxicity, but does not improve antitumoral immunity. *Molecular Therapy* **18**, 1972-1982.
 - Klawonn,F., Wüstefeld,T., & Zender,L. (2010) Statistical modelling for data from experiments with short hairpin RNAs. LNCS (Lecture Notes in Computer Science (including subseries Lecture Notes in Artificial Intelligence and Lecture Notes in Bioinformatics)) **6065**, 79-90.
 - Wuestefeld,T. & Zender,L. (2010) DLC1 and liver cancer: the Akt connection. *Gastroenterology* **139**, 1093-1096.
 - Zender,L., Villanueva,A., Tovar,V., Sia,D., Chiang,D.Y., & Llovet,J.M. (2010) Cancer gene discovery in hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology* **52**, 921-929.
 - Kühnel,F., Gürvelik,E., Wirth,T.C., Strüver,N., Malek,N.P., Müller-Schilling,M., Manns,M.P., Carnero,A., Zender,L. & Kubicka,S. (2010) Targeting of p53-transcriptional dysfunction by conditionally replicating adenovirus is not limited by p53-homologues. *Molecular Therapie* **18(5)**, 936-946
 - Xu,M.Z., Chan,S.W., Liu,A.M., Wong,K.F., Fan,S.T., Chen,J., Poon,R.T., Zender,L., Lowe,S.W., Hong,W., & Luk,J.M. (2011) AXL receptor kinase is a mediator of YAP-dependent oncogenic functions in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* **30(10)**, 1229-1240
 - Sawey,E., Chanrion,M., Cai,C., Wu,G., Zhang,J., Zender,L., Zhao,A., Busuttill,R., Yee,H., Stein,L., French,D., Finn,R., Lowe,S. & Powers,S. (2011) Identification of a Therapeutic Strategy Targeting Amplified FGF19 in Liver Cancer by Oncogenomic Screening. *Cancer Cell* **19(3)**, 347-358
- Abt. für Molekulare Strukturbiologie | Prof. Dr. Dirk Heinz**
- Brocker,M.J., Schomburg,S., Heinz,D.W.* , Jahn,D., Schubert,W.D., & Moser,J. (2010) Crystal structure of the nitrogenase-like dark operative protochlorophyllide oxidoreductase catalytic complex (ChlN/ChlB)₂. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 27336-27345.
 - Carius,Y., Christian,H., Faust,A., Zander,U., Klink,B.U.* , Kornberger,P., Kohring,G.W., Giffhorn,F., & Scheidig,A.J. (2010) Structural insight into substrate differentiation of the sugar-metabolizing enzyme galactitol dehydrogenase from *Rhodobacter sphaeroides* D. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 20006-20014.
 - Ferraris,D.M., Gherardi,E., Di,Y., Heinz,D.W.* , & Niemann,H. (2010) Ligand-mediated dimerization of the Met receptor tyrosine kinase by the bacterial invasion protein InlB. *Journal of Molecular Biology* **395**, 522-532.
 - Haffke,M., Menzel,A., Carius,Y., Jahn,D., & Heinz,D.W.* (2010) Structures of the nucleotide-binding domain of the human ABCB6 transporter and its complexes with nucleotides. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **66**, 979-987.
 - Heinemann,I.U., Schulz,C., Schubert,W.D., Heinz,D.W.* , Wang,Y.G., Kobayashi,Y., Awa,Y., Wachi,M., Jahn,D., & Jahn,M. (2010) Structure of the heme biosynthetic *Pseudomonas aeruginosa* porphobilinogen synthase in complex with the antibiotic alaremycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **54**, 267-272.
 - Heinz,D.W.* , Betzel,C., & Wilmanns,M. (2010) Highlight: of systems and structures. *Biological Chemistry* **391**, 717-718.
 - Hertiani,T., Edrada-Ebel,R., Ortlepp,S., van Soest,R.W., de Voogd,N.J., Wray,V., Hentschel,U., Kozytska,S., Muller,W.E., & Proksch,P. (2010) From anti-fouling to biofilm inhibition: New cytotoxic secondary metabolites from two Indonesian *Agelas* sponges. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **18**, 1297-1311.
 - Ibrahim,S.R., Min,C.C., Teuscher,F., Ebel,R., Kakoschke,C., Lin,W., Wray,V., Edrada-Ebel,R., & Proksch,P. (2010) Callyaerins A-F and H, new cytotoxic cyclic peptides from the Indonesian marine sponge *Callyspongia aerizusa*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **18**, 4947-4956.
 - Kampfer,P., Busse,H.J., Tindall,B.J., Nitz,M., & Grun-Wollny,I. (2010) *Nonomuraea rosea* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **60**, 1118-1124.
 - Klink,B.U., Barden,S., Heidler,T.V., Borchers,C., Ladwein,M., Stradal,T.B.* , Rottner,K., & Heinz,D.W.* (2010) Structure of Shigella IpgB2 in complex with human RhoA: implications for the mechanism of bacterial guanine nucleotide exchange factor mimicry. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 17197-17208.
 - Klink,B.U.* & Scheidig,A.J. (2010) New insight into the dynamic properties and the active site architecture of H-Ras p21 revealed by X-ray crystallography at very high resolution. *BMC Structural Biology* **10**, 38.
 - Klodmann,J., Sunderhaus,S., Nitz,M., Jänsch,L., & Braun,H.P. (2010) Internal architecture of mitochondrial complex I from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **22**, 797-810.
 - Layer,G., Reichelt,J., Jahn,D., & Heinz,D.W.* (2010) Structure and function of enzymes in heme biosynthesis. *Protein Science* **19**, 1137-1161.
 - Marin,M., Perez-Pantoja,D., Donoso,R., Wray,V., Gonzalez,B., & Pieper,D.H.* (2010) Modified 3-oxoadipate pathway for the biodegradation of methylaromatics in *Pseudomonas reinekei* MT1. *Journal of Bacteriology* **192**, 1543-1552.
 - Moghaddam,F.M., Farimani,M.M., Seirafi,M., Taheri,S., Khavasi,H.R., Sendker,J., Proksch,P., Wray,V., & Edrada,R. (2010) Sesterterpenoids and other constituents of *Salvia sahendica*. *Journal of Natural Products* **73**, 1601-1605.
 - Palme,O., Comanescu,G., Stoineva,I., Radel,S., Benes,E., Develter,D., Wray,V., & Lang,S. (2010) Sphorolipids from *Candida bombicola*: Cell separation by ultrasonic particle manipulation. *European Journal of Lipid Science and Technology* **112**, 663-673.
 - Rand,K., Noll,C., Schiebel,H.M., Kemken,D., Dulcks,T., Kalesse,M., Heinz,D.W.* , & Layer,G. (2010) The oxygen-independent coproporphyrinogen III oxidase HemN utilizes harderoporphyrinogen as a reaction intermediate during conversion of coproporphyrinogen III to protoporphyrinogen IX. *Biological Chemistry* **391**, 55-63.
 - Solbak,S.M., Reksten,T.R., Wray,V., Bruns,K., Horvli,O., Raae,A.J., Henklein,P., Henklein,P., Roder,R., Mitzner,D., Schubert,U., & Fossen,T. (2010) The intriguing cyclophilin A-HIV-1 Vpr interaction: prolyl cis/trans isomerisation catalysis and specific binding. *BMC Structural Biology* **10**, 31.

- Tomala, M., Lavrentieva, A., Moretti, P., Rinas, U., Kasper, C., Stahl, F., Schambach, A., Warlich, E., Martin, U., Cantz, T., & Scheper, T. (2010) Preparation of bioactive soluble human leukemia inhibitory factor from recombinant *Escherichia coli* using thioredoxin as fusion partner. *Protein Expression and Purification* **73**, 51-57.
- Wei, M.X., Hu, P., Wang, P., Naruse, S., Nokihara, K., Wray, V., & Ozaki, T. (2010) Possible key residues that determine left gastric artery blood flow response to PACAP in dogs. *World Journal of Gastroenterology* **16**, 4865-4870.
- Wilke, S., Krausze, J., Gossen, M., Gröbe, L., Jäger, V., Gherardi, E., van den Heuvel, J., & Büssow, K. (2010) Glycoprotein production for structure analysis with stable, glycosylation mutant CHO cell lines established by fluorescence-activated cell sorting. *Protein Science* **19**, 1264-1271.
- Wilkens, A., Paulsen, J., Wray, V., & Winterhalter, P. (2010) Structures of two novel trimeric stilbenes obtained by horseradish peroxidase catalyzed biotransformation of trans-resveratrol and (-)-epsilon-viniferin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**, 6754-6761.
- Wolfram, K., Schmidt, J., Wray, V., Milkowski, C., Schliemann, W., & Strack, D. (2010) Profiling of phenylpropanoids in transgenic low-sinapine oilseed rape (*Brassica napus*). *Phytochemistry* **71**, 1076-1084.
- Xu, J., Aly, A.H., Wray, V., & Proksch, P. (2010) Polyketide derivatives of endophytic fungus *Pestalotiopsis* sp. isolated from the Chinese mangrove plant *Rhizophora mucronata*. *Tetrahedron Letters* **52**, 21-25.
- Zakikhany, K., Harrington, C.R., Nimtz, M., Hinton, J.C., & Römling, U. (2010) Unphosphorylated CsgD controls biofilm formation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Molecular Microbiology* **77**, 771-786.
- Aly, A.H., Debbab, A., Clements, C., Edrada-Ebel, R., Orlikova, B., Diederich, M., Wray, V., Lin, W., & Proksch, P. (2011) NF kappa B inhibitors and antitrypanosomal metabolites from endophytic fungus *Penicillium* sp. isolated from *Limonium tubiflorum*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **19**, 414-421.
- Esatbeyoglu, T., Jaschok-Kentner, B., Wray, V., & Winterhalter, P. (2011) Structure elucidation of procyanidin oligomers by low-temperature 1H NMR spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**, 62-69.
- Quade, N., Dieckmann, M., Haffke, M., Heroven, A.K., Dersch, P., & Heinz, D.W.* (2011) Structure of the effector-binding domain of the LysR-type transcription factor RovM from *Yersinia pseudotuberculosis*. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **67**, 81-90.
- Shiloach, J. & Rinas, U. (2011) Bacterial cultivation for producing of proteins and other biological products. In Manual of industrial microbiology and biotechnology (Demain, A.L., ed), American Society for Microbiology (ASM), Washington DC., in press
- Fraatz, M.A., Riemer, S.J.L., Stober, R., Kasper, R., Nimtz, M., Berger, R.G., & Zorn, H. (2011) A novel oxygenase from *Pleurotus sapidus* transforms valencene to nootkatone. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, in press

AG Biophysikalische Analytik | Dr. Victor Wray

- Hertiani, T., Edrada-Ebel, R., Ortlepp, S., van Soest, R.W., de Voogd, N.J., Wray, V., Hentschel, U., Kozytska, S., Müller, W.E., & Proksch, P. (2010) From anti-fouling to biofilm inhibition: New cytotoxic secondary metabolites from two Indonesian Agelas sponges. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **18**, 1297-1311.
- Ibrahim, S.R., Min, C.C., Teuscher, F., Ebel, R., Kakoschke, C., Lin, W., Wray, V., Edrada-Ebel, R., & Proksch, P. (2010) Callyaerins A-F and H, new cytotoxic cyclic peptides from the Indonesian marine sponge *Callyspongia aerizusa*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **18**, 4947-4956.
- Marin, M., Perez-Pantoja, D., Donoso, R., Wray, V., Gonzalez, B., & Pieper, D.H.* (2010) Modified 3-oxoadipate pathway for the biodegradation of methylaromatics in *Pseudomonas reinekei* MT1. *Journal of Bacteriology* **192**, 1543-1552.
- Moghaddam, F.M., Farimani, M.M., Seirafi, M., Taheri, S., Khavasi, H.R., Sendker, J., Proksch, P., Wray, V., & Edrada, R. (2010) Sesterterpenoids and other constituents of *Salvia sahendica*. *Journal of Natural Products* **73**, 1601-1605.
- Palme, O., Comanescu, G., Stoineva, I., Radel, S., Benes, E., Develter, D., Wray, V., & Lang, S. (2010) Sophorolipids from *Candida bombicola*: Cell separation by ultrasonic particle manipulation. *European Journal of Lipid Science and Technology* **112**, 663-673.
- Rand, K., Noll, C., Schiebel, H.M., Kemken, D., Dulcks, T., Kalesse, M., Heinz, D.W.*, & Layer, G. (2010) The oxygen-independent coproporphyrinogen III oxidase HemN utilizes harderoporphyrinogen as a reaction intermediate during conversion of coproporphyrinogen III to protoporphyrinogen IX. *Biological Chemistry* **391**, 55-63.
- Solbak, S.M., Reksten, T.R., Wray, V., Bruns, K., Horvli, O., Raae, A.J., Henklein, P., Henklein, P., Roder, R., Mitzner, D., Schubert, U., & Fossen, T. (2010) The intriguing cyclophilin A-HIV-1 Vpr interaction: prolyl cis/trans isomerisation catalysis and specific binding. *BMC Structural Biology* **10**, 31.
- Tomala, M., Lavrentieva, A., Moretti, P., Rinas, U., Kasper, C., Stahl, F., Schambach, A., Warlich, E., Martin, U., Cantz, T., & Scheper, T. (2010) Preparation of bioactive soluble human leukemia inhibitory factor from recombinant *Escherichia coli* using thioredoxin as fusion partner. *Protein Expression and Purification* **73**, 51-57.
- Wei, M.X., Hu, P., Wang, P., Naruse, S., Nokihara, K., Wray, V., & Ozaki, T. (2010) Possible key residues that determine left gastric artery blood flow response to PACAP in dogs. *World Journal of Gastroenterology* **16**, 4865-4870.
- Wilke, S., Krausze, J., Gossen, M., Gröbe, L., Jäger, V., Gherardi, E., van den Heuvel, J., & Büssow, K. (2010) Glycoprotein production for structure analysis with stable, glycosylation mutant CHO cell lines established by fluorescence-activated cell sorting. *Protein Science* **19**, 1264-1271.
- Wilkens, A., Paulsen, J., Wray, V., & Winterhalter, P. (2010) Structures of two novel trimeric stilbenes obtained by horseradish peroxidase catalyzed biotransformation of trans-resveratrol and (-)-epsilon-viniferin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**, 6754-6761.
- Wolfram, K., Schmidt, J., Wray, V., Milkowski, C., Schliemann, W., & Strack, D. (2010) Profiling of phenylpropanoids in transgenic low-sinapine oilseed rape (*Brassica napus*). *Phytochemistry* **71**, 1076-1084.
- Xu, J., Aly, A.H., Wray, V., & Proksch, P. (2010) Polyketide derivatives of endophytic fungus *Pestalotiopsis* sp. isolated from the Chinese mangrove plant *Rhizophora mucronata*. *Tetrahedron Letters* **52**, 21-25.
- Zakikhany, K., Harrington, C.R., Nimtz, M., Hinton, J.C., & Römling, U. (2010) Unphosphorylated CsgD controls biofilm formation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Molecular Microbiology* **77**, 771-786.
- Aly, A.H., Debbab, A., Clements, C., Edrada-Ebel, R., Orlikova, B., Diederich, M., Wray, V., Lin, W., & Proksch, P. (2011) NF kappa B inhibitors and antitrypanosomal metabolites from endophytic fungus *Penicillium* sp. isolated from *Limonium tubiflorum*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **19**, 414-421.
- Esatbeyoglu, T., Jaschok-Kentner, B., Wray, V., & Winterhalter, P. (2011) Structure elucidation of procyanidin oligomers by low-temperature 1H NMR spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**, 62-69.
- Quade, N., Dieckmann, M., Haffke, M., Heroven, A.K., Dersch, P., & Heinz, D.W.* (2011) Structure of the effector-binding domain of the LysR-type transcription factor RovM from *Yersinia pseudotuberculosis*. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **67**, 81-90.

- Shiloach, J. & Rinas, U. (2011) Bacterial cultivation for producing of proteins and other biological products. In Manual of industrial microbiology and biotechnology (Demain, A.L., ed), American Society for Microbiology (ASM), Washington DC., in press
- Fraatz, M.A., Riemer, S.J.L., Stober, R., Kaspera, R., Nimtz, M., Berger, R.G., & Zorn, H. (2011) A novel oxygenase from *Pleurotus sapidus* transforms valencene to nootkatone. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, in press

AG Rekombinante Proteinexpression | Dr. Joop van den Heuvel

- Lu, X., Sun, J., Nimtz, M., Wissing, J., Zeng, A.-P., & Rinas, U. (2010) The intra- and extracellular proteome of *Aspergillus niger* growing on defined medium with xylose or maltose as carbon substrate. *Microbial Cell Factories* **9**, 1-13.
- Wilke, S., Krausze, J., Gossen, M., Gröbe, L., Jäger, V., Gherardi, E., van den Heuvel, J., & Bussov, K. (2010) Glycoprotein production for structure analysis with stable, glycosylation mutant CHO cell lines established by fluorescence-activated cell sorting. *Protein Science* **19**, 1264-1271.
- Bals, C., Schambach, A., Meyer, J., Scheper, T., & Rinas, U. (2011) Expression and purification of bioactive soluble murine stem cell factor from recombinant *Escherichia coli* using thioredoxin as fusion partner. *Journal of Biotechnology* **152**, 1-8.
- Shiloach, J. & Rinas, U. (2011) Bacterial cultivation for producing of proteins and other biological products. In: Manual of industrial microbiology and biotechnology (Demain, A.L., ed.), American Society for Microbiology (ASM), Washington DC, in press.

AG Zelluläre Proteomforschung | Dr. Lothar Jänsch

- Badar, M., Hemmen, K., Nimtz, M., Stieve, M., Stiesch, M., Lenarz, T., Hauser, H., Möllmann, U., Vogt, S., Schnabelrauch, M., & Müller, P.P.* (2010) Evaluation of madurahydroxylactone as a slow release antibacterial implant coating. *Open Biomedical Engineering Journal* **4**, 263-270.
- Eisele, N., Linke, D., Bitzer, K., Na'amnieh, S., Nimtz, M., & Berger, R.G. (2010) The first characterized asparaginase from a basidiomycete, *Flammulina velutipes*. *Bioresource Technology* **102**, 3316-3321.
- El-Banna, A., Hajirezaei, M.R., Wissing, J., Ali, Z., Vaas, L., Heine-Dobbernack, E., Jacobsen, H.J., Schumacher, H.M., & Kiesecker, H. (2010) Over-expression of PR-10a leads to increased salt and osmotic tolerance in potato cell cultures. *Journal of Biotechnology* **150**, 277-287.
- Klodmann, J., Sunderhaus, S., Nimtz, M., Jänsch, L., & Braun, H.P. (2010) Internal architecture of mitochondrial complex I from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **22**, 797-810.
- Lu, X., Sun, J., Nimtz, M., Wissing, J., Zeng, A.-P., & Rinas, U. (2010) The intra- and extracellular proteome of *Aspergillus niger* growing on defined medium with xylose or maltose as carbon substrate. *Microbial Cell Factories* **9**, 1-13.
- Maahs, D.M., Siwy, J., Argiles, A., Cerna, M., Delles, C., Dominiczak, A.F., Gayard, N., Iphöfer, A., Jänsch, L., Jerums, G., Medek, K., Mischak, H., Navis, G.J., Roob, J.M., Rossing, K., Rossing, P., Rychlik, I., Schiffer, E., Schmieder, R.E., Wascher, T.C., Winkhofer-Roob, B.M., Zimmerli, L.U., Zurbig, P., & Snell-Bergeon, J.K. (2010) Urinary collagen fragments are significantly altered in diabetes: a link to pathophysiology. *PLoS ONE* **5**.
- Mischak, H., Kolch, W., Aivaliotis, M., Bouyssie, D., Court, M., Dihazi, H., Dihazi, G.H., Franke, J., Garin, J., de Peredo, A.G., Iphöfer, A., Jänsch, L., Lacroix, C., Makridakis, M., Masselon, C., Metzger, J., Monsarrat, B., Mrug, M., Norling, M., Novak, J., Pich, A., Pitt, A., Bongcam-Rudloff, E., Siwy, J., Suzuki, H., Thongboonkerd, V., Wang, L.-S., Zoidakis, J., Zurbig, P., Schanstra, J.P., & Vlahou, A. (2010) Comprehensive human urine standards for comparability and standardization in clinical proteome analysis. *Proteomics - Clinical Applications* **4**, 464-478.

- Pommerenke, C., Müsken, M., Becker, T., Dötsch, A., Klawonn, F., & Häubler, S. (2010) Global genotype-phenotype correlations in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathogens* **6**, 89-90.
- Steinke, N., Kaller, M., Nimtz, M., Baro, A., & Laschat, S. (2010) Columnar liquid crystals derived from crown ethers with two lateral ester-substituted ortho-terphenyl units: Unexpected destabilisation of the mesophase by potassium iodide. *Liquid Crystals* **37**, 1139-1149.
- Stepanova, T., Smal, I., van, H.J., Akinci, U., Liu, Z., Miedema, M., Limpens, R., van, H.M., van der, R.M., Poot, R., Grosveld, F., Mommaas, M., Meijering, E., & Galjart, N. (2010) History-dependent catastrophes regulate axonal microtubule behavior. *Current biology* **20**, 1023-1028.
- Trunk, K., Benkert, B., Quack, N., Munch, R., Scheer, M., Garbe, J., Jänsch, L., Trost, M., Wehland, J., Buer, J., Jahn, M., Schobert, M., & Jahn, D. (2010) Anaerobic adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: definition of the Anr and Dnr regulons. *Environmental Microbiology* **12**, 1719-1733.
- Tschumitschew, K. & Klawonn, F. (2010) Incremental quantile estimation. *Evolving Systems* **1**, 253-264.
- Tschumitschew, K. & Klawonn, F. (2010) The need for benchmarks with data from stochastic processes and meta-models in evolving systems. In Proceedings of the International Symposium on Evolving Intelligent Systems (Angelov, P., Filev, D., & Kasabov, N., eds), pp. 30-33. SSAISB, Leicester.
- Tschumitschew, K. & Klawonn, F. (2010) AVEDA: Statistical tests for finding interesting visualisations. *5711 LNAI (Part 1) Lecture Notes in Computer Science* (including subseries Lecture Notes in Artificial Intelligence and Lecture Notes in Bioinformatics), 235-242.
- Krone, M. & Klawonn, F. (2011) Rank correlation coefficient correction by removing worst cases. In: Information Processing and Management of Uncertainty in Knowledge-Based Systems: Theory and Methods (Hüllermeier, E., Kruse, R., & Hoffmann, F., eds.), Springer, Berlin, pp. 356-364.
- Winkler, R., Klawonn, F., & Kruse, R. (2011) Fuzzy clustering with polynomial fuzzifier function in connection with m-estimators. *Applied and Computational Mathematics* **10**, 146-163.
- Eberl, L. & Riedel, K. (2011) Mining quorum sensing regulated proteins - role of bacterial cell-to-cell communication in global gene regulation as assessed by proteomics. *Proteomics*, in press
- Hebecker, S., Arendt, W., Heinemann, I.U., Tiefenau, J.H., Nimtz, M., Rohde, M., Soll, D., & Moser, J. (2011) Alanyl-phosphatidylglycerol synthase: mechanism of substrate recognition during tRNA-dependent lipid modification in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, in press.
- Hemmen, K., Reinl, T., Buttler, K., Behler, F., Dieken, H., Jänsch, L., Wiltig, J., & Weich, H.A.*. (2011) High-resolution mass spectrometric analysis of the secretome from mouse lung endothelial progenitor cells. *Angiogenesis*, in press.

AG Mikrobielle Proteomik | Prof. Dr. Katharina Riedel

- Bosshard, F., Riedel, K., Schneider, T., Geiser, C., Bucheli, M., & Egli, T. (2010) Protein oxidation and aggregation in UVA-irradiated *Escherichia coli* cells as signs of accelerated cellular senescence. *Environmental Microbiology* **12**, 2931-2945.
- Carranza, P., Grunau, A., Schneider, T., Hartmann, J., Lehner, A., Stephan, R., Gehrig, P., Grossmann, J., Groebel, K., Hoelzle, L.E., Eberl, L., & Riedel, K. (2010) A gel-free quantitative proteomics approach to investigate temperature adaptation of the food-borne pathogen *Cronobacter turicensis* 3032. *Proteomics* **10**, 3248-3261.
- Grunau, A. & Riedel, K. (2011) Exoenzymes. In Encyclopaedia of Geobiology (Reiter, J. & Thiel, V., eds), pp. 355-359. Springer.

- Hartmann, I., Carranza, P., Lehner, A., Stephan, R., Eberl, L., & Riedel, K. (2010) Genes involved in *Cronobacter sakazakii* biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology* **76**, 2251-2261.
 - Lumjaktase, P., Aguilar, C., Battin, T., Riedel, K., & Eberl, L. (2010) Construction of self-transmissible green fluorescent protein-based biosensor plasmids and their use for identification of N-acyl homoserine-producing bacteria in lake sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **76**, 6119-6127.
 - Moretti, M., Grunau, A., Minerdi, D., Gehrig, P., Roschitzki, B., Eberl, L., Garibaldi, A., Gullino, M.L., & Riedel, K. (2010) A proteomics approach to study synergistic and antagonistic interactions of the fungal-bacterial consortium *Fusarium oxysporum* wild-type MSA 35. *Proteomics* **10**, 3292-3320.
 - Schneider, T. & Riedel, K. (2010) Environmental proteomics: analysis of structure and function of microbial communities. *Proteomics* **10**, 785-798.
 - Schneider, T. & Riedel, K. (2010) Environmental proteomics: Studying structure and function of microbial communities. In *Geomicrobiology: Molecular and Environmental Perspective* (Barton, L.L., Mandl, M., & Loy, A., eds), pp. 91-108. Springer.
 - Schneider, T., Gerrits, B., Gassmann, R., Schmid, E., Gessner, M.O., Richter, A., Battin, T., Eberl, L., & Riedel, K. (2010) Proteome analysis of fungal and bacterial involvement in leaf litter decomposition. *Proteomics* **10**, 1819-1830.
 - Srinivas, N., Jetter, P., Ueberbacher, B.J., Werneburg, M., Zerbe, K., Steinmann, J., Van der, M.B., Bernardini, F., Lederer, A., Dias, R.L., Misson, P.E., Henze, H., Zumbunn, J., Gombert, F.O., Obrecht, D., Hunziker, P., Schauer, S., Ziegler, U., Kach, A., Eberl, L., Riedel, K., DeMarco, S.J., & Robinson, J.A. (2010) Peptidomimetic antibiotics target outer-membrane biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Science* **327**, 1010-1013.
- NG Makromolekulare Interaktionen | Prof. Dr. Christiane Ritter**
- Greenwald, J., Buhtz, C., Ritter, C., Kwiatkowski, W., Choe, S., Maddelein, M.L., Ness, F., Cescau, S., Soragni, A., Leitz, D., Saupe, S.J., & Riek, R. (2010) The mechanism of prion inhibition by HET-S. *Molecules and Cells* **38**, 889-899.
 - Wasmer, C., Zimmer, A., Sabate, R., Soragni, A., Saupe, S.J., Ritter, C., & Meier, B.H. (2010) Structural similarity between the prion domain of HET-s and a homologue can explain amyloid cross-seeding in spite of limited sequence identity. *Journal of Molecular Biology* **402**, 311-325.
- NG im Zentrum für Strukturelle Systembiologie am DESY | Prof. Dr. Inari Kursula**
- Chen, W.Q., Salmazo, A., Myllykoski, M., Sjoblom, B., Bidlingmaier, M., Pollak, A., Baumgartel, P., Djinic-Carugo, K., Kursula, P. *, & Lubec, G. (2010) Purification of recombinant growth hormone by clear native gels for conformational analyses: preservation of conformation and receptor binding. *Amino Acids* **39**, 859-869.
 - Huttu, J., Singh, B.K., Bhargav, S.P., Sattler, J.M., Schuler, H., & Kursula, I. (2010) Crystallization and preliminary structural characterization of the two actin-depolymerization factors of the malaria parasite. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallisation Community* **66**, 583-587.
 - Majava, V., Polverini, E., Mazzini, A., Nanekar, R., Knoll, W., Peters, J., Natali, F., Baumgartel, P., Kursula, I., & Kursula, P. (2010) Structural and functional characterization of human peripheral nervous system myelin protein P2. *PLoS ONE* **5**, e10300.
 - Myllykoski, M. & Kursula, P. *. (2010) Expression, purification, and initial characterization of different domains of recombinant mouse 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase, an enigmatic enzyme from the myelin sheath. *BMC Research Notes* **3**, 12.
 - Suresh, S., Wang, C., Nanekar, R., Kursula, P. *, & Edwardson, J.M. (2010) Myelin basic protein and myelin protein 2 act synergistically to cause stacking of lipid bilayers. *Biochemistry* **49**, 3456-3463.
 - Kursula, P. *. (2011) Structural biology insights into the autoantigens of the myelin sheath. In *Autoimmune Diseases: Symptoms, Diagnosis and Treatment* Nova, in press.
- Abt. für Medizinische Mikrobiologie | Prof. Dr. G. Singh Chhatwal**
- Abt, B., Foster, B., Lapidus, A., Clum, A., Sun, H., Pukall, R., Lucas, S., Glavina Del, R.T., Nolan, M., Tice, H., Cheng, J.F., Pitluck, S., Liolios, K., Ivanova, N., Mavromatis, K., Ovchinnikova, G., Pati, A., Goodwin, L., Chen, A., Palaniappan, K., Land, M., Hauser, L., Chang, Y.J., Jeffries, C.D., Rohde, M., Göker, M., Woyke, T., Bristow, J., Eisen, J.A., Markowitz, V., Hugenholtz, P., Kyrpides, N.C., & Klenk, H.P. (2010) Complete genome sequence of *Cellulomonas flavigena* type strain (134). *Standards in Genomic Sciences* **3**, 15-25.
 - Anderson, I., Djaio, O.D., Misra, M., Chertkov, O., Nolan, M., Lucas, S., Lapidus, A., Del Rio, T.G., Tice, H., Cheng, J.F., Tapia, R., Han, C., Goodwin, L., Pitluck, S., Liolios, K., Ivanova, N., Mavromatis, K., Mikhailova, N., Pati, A., Brambilla, E., Chen, A., Palaniappan, K., Land, M., Hauser, L., Chang, Y.J., Jeffries, C.D., Sikorski, J., Spring, S., Rohde, M., Eichinger, K., Huber, H., Wirth, R., Göker, M., Detter, J.C., Woyke, T., Bristow, J., Eisen, J.A., Markowitz, V., Hugenholtz, P., Klenk, H.P., & Kyrpides, N.C. (2010) Complete genome sequence of *Methanothermobacter feravidus* type strain (V24S). *Standards in Genomic Sciences* **3**, 315-324.
 - Aziz, R.K., Kansal, R., Aronow, B.J., Taylor, W.L., Rowe, S.L., Kubal, M., Chhatwal, G.S. *, Walker, M.J., & Kotb, M. (2010) Microevolution of group A streptococci in vivo: capturing regulatory networks engaged in sociomicrobiology, niche adaptation, and hypervirulence. *PLoS ONE* **5**, e9798.
 - Bunk, B., Schulz, A., Stammen, S., Münch, R., Warren, M.J., Rohde, M., Jahn, D., & Biedendieck, R. (2010) A short story about a big magic bug. *Bioengineered Bugs* **1**, 85-91.
 - Candela, M., Centanni, M., Fiori, J., Biagi, E., Turroni, S., Orrico, C., Bergmann, S., Hammerschmidt, S., & Brigidi, P. (2010) DnaK from *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis is a surface-exposed human plasminogen receptor upregulated in response to bile salts. *Microbiology* **156**, 1609-1618.
 - Chang, Y.J., Pukall, R., Saunders, E., Lapidus, A., Copeland, A., Nolan, M., Glavina Del, R.T., Lucas, S., Chen, F., Tice, H., Cheng, J.F., Han, C., Detter, J.C., Bruce, D., Goodwin, L., Pitluck, S., Mikhailova, N., Liolios, K., Pati, A., Ivanova, N., Mavromatis, K., Chen, A., Palaniappan, K., Land, M., Hauser, L., Jeffries, C.D., Brettin, T., Rohde, M., Göker, M., Bristow, J., Eisen, J.A., Markowitz, V., Hugenholtz, P., Kyrpides, N.C., & Klenk, H.P. (2010) Complete genome sequence of *Acidaminococcus fermentans* type strain (VR4). *Standards in Genomic Sciences* **3**, 1-14.
 - Chertkov, O., Sikorski, J., Brambilla, E., Lapidus, A., Copeland, A., Glavina Del, R.T., Nolan, M., Lucas, S., Tice, H., Cheng, J.F., Han, C., Detter, J.C., Bruce, D., Tapia, R., Goodwin, L., Pitluck, S., Liolios, K., Ivanova, N., Mavromatis, K., Ovchinnikova, G., Pati, A., Chen, A., Palaniappan, K., Land, M., Hauser, L., Chang, Y.J., Jeffries, C.D., Spring, S., Rohde, M., Göker, M., Bristow, J., Eisen, J.A., Markowitz, V., Hugenholtz, P., Kyrpides, N.C., & Klenk, H.P. (2010) Complete genome sequence of *Aminobacterium colombiense* type strain (ALA-1). *Standards in Genomic Sciences* **2**, 280-289.
 - Clum, A., Tindall, B.J., Sikorski, J., Ivanova, N., Mavromatis, K., Lucas, S., Glavina Del, R.T., Nolan, M., Chen, F., Tice, H., Pitluck, S., Cheng, J.F., Chertkov, O., Brettin, T., Han, C., Detter, J.C., Kuske, C., Bruce, D., Goodwin, L., Ovchinnikova, G., Pati, A., Mikhailova, N., Chen, A., Palaniappan, K., Land, M., Hauser, L., Chang, Y.J., Jeffries, C.D., Chain, P., Rohde, M., Göker, M., Bristow, J., Eisen, J.A., Markowitz, V., Hugenholtz, P., Kyrpides, N.C., Klenk, H.P., & Lapidus, A. (2010) Erratum to: Complete genome sequence of *Pirellula staleyii* type strain (ATCC 27377). *Standards in Genomic Sciences* **2**, 228-288.

- Copeland,A., Sikorski,J., Lapidus,A., Nolan,M., Glavina,T., Del,R., Lucas,S., Chen,F., Tice,H., Pitluck,S., Cheng,J.F., Pukall,R., Chertkov,O., Brettin,T., Han,C., Kuske,C., Bruce,D., Goodwin,L., Ivanova,N., Mavromatis,K., Mikhailova,N., Chen,A., Palaniappan,K., Chain,P., Rohde,M., Göker,M., Bristow,J., Eisen,J.A., Markowitz,V., Hugenholtz,P., Kyrpides,N.C., Klenk,H.P., & Detter,J.C. (2010) Erratum to: Complete genome sequence of *Atopobium parvulum* type strain (IPP 1246). *Standards in Genomic Sciences* **2**, 361-362.
- Del Rio,T.G., Chertkov,O., Yasawong,M., Lucas,S., Deshpande,S., Cheng,J.F., Detter,C., Tapia,R., Han,C., Goodwin,L., Pitluck,S., Liolios,K., Ivanova,N., Mavromatis,K., Pati,A., Chen,A., Palaniappan,K., Land,M., Hauser,L., Chang,Y.J., Jeffries,C.D., Rohde,M., Pukall,R., Sikorski,J., Göker,M., Woyke,T., Bristow,J., Eisen,J.A., Markowitz,V., Hugenholtz,P., Kyrpides,N.C., Klenk,H.P., & Lapidus,A. (2010) Complete genome sequence of *Intrasporangium calvum* type strain (7 KIP). *Standards in Genomic Sciences* **3**, 294-303.
- Dietrich,N., Rohde,M., Geffers,R., Kroger,A., Hauser,H., Weiss,S., & Gekara,N.O. (2010) Mast cells elicit proinflammatory but not type I interferon responses upon activation of TLRs by bacteria. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 8748-8753.
- Djao,O.D., Zhang,X., Lucas,S., Lapidus,A., Del Rio,T.G., Nolan,M., Tice,H., Cheng,J.F., Han,C., Tapia,R., Goodwin,L., Pitluck,S., Liolios,K., Ivanova,N., Mavromatis,K., Mikhailova,N., Ovchinnikova,G., Pati,A., Brambilla,E., Chen,A., Palaniappan,K., Land,M., Hauser,L., Chang,Y.J., Jeffries,C.D., Rohde,M., Sikorski,J., Spring,S., Göker,M., Detter,J.C., Woyke,T., Bristow,J., Eisen,J.A., Markowitz,V., Hugenholtz,P., Kyrpides,N.C., & Klenk,H.P. (2010) Complete genome sequence of *Syntrophothermus lipocalidus* type strain (TGB-C1). *Standards in Genomic Sciences* **3**, 268-275.
- Foster,B., Pukall,R., Abt,B., Nolan,M., Glavina Del,R.T., Chen,F., Lucas,S., Tice,H., Pitluck,S., Cheng,J.F., Chertkov,O., Brettin,T., Han,C., Detter,J.C., Bruce,D., Goodwin,L., Ivanova,N., Mavromatis,K., Pati,A., Mikhailova,N., Chen,A., Palaniappan,K., Land,M., Hauser,L., Chang,Y.J., Jeffries,C.D., Chain,P., Rohde,M., Goker,M., Bristow,J., Eisen,J.A., Markowitz,V., Hugenholtz,P., Kyrpides,N.C., & Lapidus,A. (2010) Complete genome sequence of *Xylanimonas cellulolytica* type strain (XIL07). *Standards in Genomic Sciences* **2**, 1-8.
- Garbe,J., Wesche,A., Bunk,B., Kazmierczak,M., Selezska,K., Rohde,C., Sikorski,J., Rohde,M., Jahn,D., & Schobert,M. (2010) Characterization of JG024, a *Pseudomonas aeruginosa* PB1-like broad host range phage under simulated infection conditions. *BMC Microbiology* **10**, 301.
- Glavina Del,R.T., Abt,B., Spring,S., Lapidus,A., Nolan,M., Tice,H., Copeland,A., Cheng,J.F., Chen,F., Bruce,D., Goodwin,L., Pitluck,S., Ivanova,N., Mavromatis,K., Mikhailova,N., Pati,A., Chen,A., Palaniappan,K., Land,M., Hauser,L., Chang,Y.J., Jeffries,C.D., Chain,P., Saunders,E., Detter,J.C., Brettin,T., Rohde,M., Göker,M., Bristow,J., Eisen,J.A., Markowitz,V., Hugenholtz,P., Kyrpides,N.C., & Lucas,S. (2010) Complete genome sequence of *Chitinophaga pinensis* type strain (UQM 2034). *Standards in Genomic Sciences* **2**, 87-95.
- Göker,M., Held,B., Lapidus,A., Nolan,M., Spring,S., Yasawong,M., Lucas,S., Glavina Del,R.T., Tice,H., Cheng,J.F., Goodwin,L., Tapia,R., Pitluck,S., Liolios,K., Ivanova,N., Mavromatis,K., Mikhailova,N., Pati,A., Chen,A., Palaniappan,K., Brambilla,E., Land,M., Hauser,L., Chang,Y.J., Jeffries,C.D., Brettin,T., Detter,J.C., Han,C., Rohde,M., Sikorski,J., Woyke,T., Bristow,J., Eisen,J.A., Markowitz,V., Hugenholtz,P., Kyrpides,N.C., & Klenk,H.P. (2010) Complete genome sequence of *Ignisphaera aggregans* type strain (AQ1.S1). *Standards in Genomic Sciences* **3**, 66-75.
- Göker,M., Held,B., Lucas,S., Nolan,M., Yasawong,M., Glavina Del,R.T., Tice,H., Cheng,J.F., Bruce,D., Detter,J.C., Tapia,R., Han,C., Goodwin,L., Pitluck,S., Liolios,K., Ivanova,N., Mavromatis,K., Mikhailova,N., Pati,A., Chen,A., Palaniappan,K., Land,M., Hauser,L., Chang,Y.J., Jeffries,C.D., Rohde,M., Sikorski,J., Pukall,R., Woyke,T., Bristow,J., Eisen,J.A., Markowitz,V., Hugenholtz,P., Kyrpides,N.C., & Lapidus,A. (2010) Complete genome sequence of *Olsenella uli* type strain (VPI D76D-27C). *Standards in Genomic Sciences* **3**, 76-84.
- Gronow,S., Welnitz,S., Lapidus,A., Nolan,M., Ivanova,N., Glavina Del,R.T., Copeland,A., Chen,F., Tice,H., Pitluck,S., Cheng,J.F., Saunders,E., Brettin,T., Han,C., Detter,J.C., Bruce,D., Goodwin,L., Land,M., Hauser,L., Chang,Y.J., Jeffries,C.D., Pati,A., Mavromatis,K., Mikhailova,N., Chen,A., Palaniappan,K., Chain,P., Rohde,M., Göker,M., Bristow,J., Eisen,J.A., Markowitz,V., Hugenholtz,P., Kyrpides,N.C., Klenk,H.P., & Lucas,S. (2010) Complete genome sequence of *Veillonella parvula* type strain (Te3). *Standards in Genomic Sciences* **2**, 57-65.
- Han,C., Gu,W., Zhang,X., Lapidus,A., Nolan,M., Copeland,A., Lucas,S., Del Rio,T.G., Tice,H., Cheng,J.F., Tapia,R., Goodwin,L., Pitluck,S., Pagani,I., Ivanova,N., Mavromatis,K., Mikhailova,N., Pati,A., Chen,A., Palaniappan,K., Land,M., Hauser,L., Chang,Y.J., Jeffries,C.D., Schneider,S., Rohde,M., Göker,M., Pukall,R., Woyke,T., Bristow,J., Eisen,J.A., Markowitz,V., Hugenholtz,P., Kyrpides,N.C., Klenk,H.P., & Detter,J.C. (2010) Complete genome sequence of *Thermaerobacter marianensis* type strain (7p75a). *Standards in Genomic Sciences* **3**, 337-345.
- Hänisch,J., Ehinger,J., Ladwein,M., Rohde,M., Derivery,E., Bosse,T., Steffen,A., Bumann,D., Misselwitz,B., Hardt,W.D., Gautreau,A., Stradal,T.B.*., & Rottner,K. (2010) Molecular dissection of Salmonella-induced membrane ruffling versus invasion. *Cellular Microbiology* **12**, 84-98.
- Hoffmann,C., Berking,A., Agerer,F., Buntru,A., Neske,F., Chhatwal,G.S.*., Ohlsen,K., & Hauck,C.R. (2010) Caveolin limits membrane microdomain mobility and integrin-mediated uptake of fibronectin-binding pathogens. *Journal of Cell Science* **123**, 4280-4291.
- Hu,Y., van der,G.R., Besra,G.S., Gurcha,S.S., Liu,A., Rohde,M., Singh,M., & Coates,A. (2010) 3-Ketosteroid 9alpha-hydroxylase is an essential factor in the pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Microbiology* **75**, 107-121.
- Itzek,A., Gillen,C.M., Fulde,M., Friedrichs,C., Rodloff,A.C., Chhatwal,G.S.*., & Nitsche-Schmitz,D.P. (2010) Contribution of plasminogen activation towards the pathogenic potential of oral streptococci. *PLoS ONE* **5**, e13826.
- Ivanova,N., Sikorski,J., Jando,M., Munk,C., Lapidus,A., Glavina Del,R.T., Copeland,A., Tice,H., Cheng,J.F., Lucas,S., Chen,F., Nolan,M., Bruce,D., Goodwin,L., Pitluck,S., Mavromatis,K., Mikhailova,N., Pati,A., Chen,A., Palaniappan,K., Land,M., Hauser,L., Chang,Y.J., Jeffries,C.D., Meincke,L., Brettin,T., Detter,J.C., Rohde,M., Göker,M., Bristow,J., Eisen,J.A., Markowitz,V., Hugenholtz,P., Kyrpides,N.C., & Klenk,H.P. (2010) Complete genome sequence of *Geodermatophilus obscurus* type strain (G-20). *Standards in Genomic Sciences* **2**, 158-167.
- Ivanova,N., Sikorski,J., Jando,M., Lapidus,A., Nolan,M., Lucas,S., Del Rio,T.G., Tice,H., Copeland,A., Cheng,J.F., Chen,F., Bruce,D., Goodwin,L., Pitluck,S., Mavromatis,K., Ovchinnikova,G., Pati,A., Chen,A., Palaniappan,K., Land,M., Hauser,L., Chang,Y.J., Jeffries,C.D., Chain,P., Saunders,E., Han,C., Detter,J.C., Brettin,T., Rohde,M., Göker,M., Bristow,J., Eisen,J.A., Markowitz,V., Hugenholtz,P., Klenk,H.P., & Kyrpides,N.C. (2010) Complete genome sequence of *Gordonia bronchialis* type strain (3410). *Standards in Genomic Sciences* **2**, 19-28.
- Ivanova,N., Daum,C., Lang,E., Abt,B., Kopitz,M., Saunders,E., Lapidus,A., Lucas,S., Glavina Del,R.T., Nolan,M., Tice,H., Copeland,A., Cheng,J.F., Chen,F., Bruce,D., Goodwin,L., Pitluck,S., Mavromatis,K., Pati,A., Mikhailova,N., Chen,A., Palaniappan,K., Land,M., Hauser,L., Chang,Y.J., Jeffries,C.D., Detter,J.C., Brettin,T., Rohde,M., Göker,M., Bristow,J., Markowitz,V., Eisen,J.A., Hugenholtz,P., Kyrpides,N.C., & Klenk,H.P. (2010) Complete genome sequence of *Haliangium ochraceum* type strain (SMP-2). *Standards in Genomic Sciences* **2**, 96-106.
- Jensch,I., Gamez,G., Rothe,M., Ebert,S., Fulde,M., Somplatzki,D., Bergmann,S., Petruschka,L., Rohde,M., Nau,R., & Hammerschmidt,S. (2010) PavB is a surface-exposed adhesin of *Streptococcus pneumoniae* contributing to nasopharyngeal colonization and airways infections. *Molecular Microbiology* **77**, 22-43.
- Kaur,S.J., Nerlich,A., Bergmann,S., Rohde,M., Fulde,M., Zahner,D., Hanski,E., Zinkernagel,A., Nizet,V., Chhatwal,G.S.*., & Talay,S.R. (2010) The CXC chemokine-degrading protease SpyCep of *Streptococcus pyogenes* promotes its uptake into endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 27798-27805.

- Kiss,H., Lang,E., Lapidus,A., Copeland,A., Nolan,M., Glavina Del,R.T., Chen,F., Lucas,S., Tice,H., Cheng,J.F., Han,C., Goodwin,L., Pitluck,S., Liolios,K., Pati,A., Ivanova,N., Mavromatis,K., Chen,A., Palaniappan,K., Land,M., Hauser,L., Chang,Y.J., Jeffries,C.D., Detter,J.C., Brettin,T., Spring,S., Rohde,M., Göker,M., Woyke,T., Bristow,J., Eisen,J.A., Markowitz,V., Hugenholtz,P., Kyrpides,N.C., & Klenk,H.P. (2010) Complete genome sequence of *Denitrovibrio acetiphilus* type strain (N2460). *Standards in Genomic Sciences* **2**, 270-279.
- Kotz,A., Wagener,J., Engel,J., Routier,F., Echtenacher,B., Pich,A., Rohde,M., Hoffmann,P., Heesemann,J., & Ebel,F. (2010) The mitA gene of *Aspergillus fumigatus* is required for mannosylation of inositol-phosphorylceramide, but is dispensable for pathogenicity. *Fungal Genetics and Biology* **47**, 169-178.
- Labutti,K., Sikorski,J., Schneider,S., Nolan,M., Lucas,S., Glavina Del,R.T., Tice,H., Cheng,J.F., Goodwin,L., Pitluck,S., Liolios,K., Ivanova,N., Mavromatis,K., Mikhailova,N., Pati,A., Chen,A., Palaniappan,K., Land,M., Hauser,L., Chang,Y.J., Jeffries,C.D., Tindall,B.J., Rohde,M., Göker,M., Woyke,T., Bristow,J., Eisen,J.A., Markowitz,V., Hugenholtz,P., Kyrpides,N.C., Klenk,H.P., & Lapidus,A. (2010) Complete genome sequence of *Planctomyces limnophilus* type strain (Mu 290). *Standards in Genomic Sciences* **3**, 47-56.
- Labutti,K., Mayilraj,S., Clum,A., Lucas,S., Glavina Del,R.T., Nolan,M., Tice,H., Cheng,J.F., Pitluck,S., Liolios,K., Ivanova,N., Mavromatis,K., Mikhailova,N., Pati,A., Goodwin,L., Chen,A., Palaniappan,K., Land,M., Hauser,L., Chang,Y.J., Jeffries,C.D., Rohde,M., Spring,S., Göker,M., Woyke,T., Bristow,J., Eisen,J.A., Markowitz,V., Hugenholtz,P., Kyrpides,N.C., Klenk,H.P., & Lapidus,A. (2010) Permanent draft genome sequence of *Dethiosulfobrevibrio peptidovorans* type strain (SEBR 4207). *Standards in Genomic Sciences* **3**, 85-92.
- Lail,K., Sikorski,J., Saunders,E., Lapidus,A., Glavina Del,R.T., Copeland,A., Tice,H., Cheng,J.F., Lucas,S., Nolan,M., Bruce,D., Goodwin,L., Pitluck,S., Ivanova,N., Mavromatis,K., Ovchinnikova,G., Pati,A., Chen,A., Palaniappan,K., Land,M., Hauser,L., Chang,Y.J., Jeffries,C.D., Chain,P., Brettin,T., Detter,J.C., Schutze,A., Rohde,M., Tindall,B.J., Göker,M., Bristow,J., Eisen,J.A., Markowitz,V., Hugenholtz,P., Kyrpides,N.C., Klenk,H.P., & Chen,F. (2010) Complete genome sequence of *Spirosoma linguale* type strain (1). *Standards in Genomic Sciences* **2**, 176-185.
- Liolios,K., Sikorski,J., Jando,M., Lapidus,A., Copeland,A., Glavina,T., Del,R., Nolan,M., Lucas,S., Tice,H., Cheng,J.F., Han,C., Woyke,T., Goodwin,L., Pitluck,S., Ivanova,N., Mavromatis,K., Mikhailova,N., Chertkov,O., Kuske,C., Chen,A., Palaniappan,K., Land,M., Hauser,L., Chang,Y.J., Jeffries,C.D., Detter,J.C., Brettin,T., Rohde,M., Göker,M., Bristow,J., Eisen,J.A., Markowitz,V., Hugenholtz,P., Kyrpides,N.C., Klenk,H.P., & Chen,F. (2010) Complete genome sequence of *Thermobispora bisporea* type strain (R51). *Standards in Genomic Sciences* **2**, 318-326.
- Maamary,P.G., Sanderson-Smith,M.L., Aziz,R.K., Hollands,A., Cole,J.N., McKay,F.C., Mearthar,J.D., Kirk,J.K., Cork,A.J., Keefe,R.J., Kansal,R.G., Sun,H., Taylor,W.L., Chhatwal,G.S*, Ginsburg,D., Nizet,V., Kotb,M., & Walker,M.J. (2010) Parameters governing invasive disease propensity of non-M1 serotype group A streptococci. *Journal of Innate Immunology* **2**, 596-606.
- Macke,L., Garritsen,H.S., Meyring,W., Hannig,H., Pagelow,U., Wormann,B., Piechaczek,C., Geffers,R., Rohde,M., Lindenmaier,W., & Dittmar,K.E.*. (2010) Evaluating maturation and genetic modification of human dendritic cells in a new polyolefin cell culture bag system. *Transfusion* **50**, 843-855.
- Marjenberg,Z.R., Ellis,I.R., Hagan,R.M., Prabhakaran,S., Hook,M., Talay,S.R.*., Potts,J.R., Staunton,D., & Schwarz-Linek,U. (2010) Cooperative binding and activation of fibronectin by a bacterial surface protein. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 1884-1894.
- Mavromatis,K., Sikorski,J., Pabst,E., Teshima,H., Lapidus,A., Lucas,S., Nolan,M., Glavina Del,R.T., Cheng,J.F., Bruce,D., Goodwin,L., Pitluck,S., Liolios,K., Ivanova,N., Mikhailova,N., Pati,A., Chen,A., Palaniappan,K., Land,M., Hauser,L., Chang,Y.J., Jeffries,C.D., Rohde,M., Spring,S., Göker,M., Wirth,R., Woyke,T., Bristow,J., Eisen,J.A., Markowitz,V., Hugenholtz,P., Klenk,H.P., & Kyrpides,N.C. (2010) Complete genome sequence of *Vulcanisaeta distributa* type strain (IC-017). *Standards in Genomic Sciences* **3**, 117-125.
- Mavromatis,K., Abt,B., Brambilla,E., Lapidus,A., Copeland,A., Deshpande,S., Nolan,M., Lucas,S., Tice,H., Cheng,J.F., Han,C., Detter,J.C., Woyke,T., Goodwin,L., Pitluck,S., Held,B., Brettin,T., Tapia,R., Ivanova,N., Mikhailova,N., Pati,A., Liolios,K., Chen,A., Palaniappan,K., Land,M., Hauser,L., Chang,Y.J., Jeffries,C.D., Rohde,M., Göker,M., Bristow,J., Eisen,J.A., Markowitz,V., Hugenholtz,P., Klenk,H.P., & Kyrpides,N.C. (2010) Complete genome sequence of *Coralimargarita akajimensis* type strain (04OKA010-24). *Standards in Genomic Sciences* **2**, 290-299.
- Mavromatis,K., Sikorski,J., Lapidus,A., Glavina Del,R.T., Copeland,A., Tice,H., Cheng,J.F., Lucas,S., Chen,F., Nolan,M., Bruce,D., Goodwin,L., Pitluck,S., Ivanova,N., Ovchinnikova,G., Pati,A., Chen,A., Palaniappan,K., Land,M., Hauser,L., Chang,Y.J., Jeffries,C.D., Chain,P., Meincke,L., Sims,D., Chertkov,O., Han,C., Brettin,T., Detter,J.C., Wahrenburg,C., Rohde,M., Pukall,R., Göker,M., Bristow,J., Eisen,J.A., Markowitz,V., Hugenholtz,P., Klenk,H.P., & Kyrpides,N.C. (2010) Complete genome sequence of *Alicyclobacillus acidocaldarius* type strain (104-1A). *Standards in Genomic Sciences* **2**, 9-18.
- Mavromatis,K., Yasawong,M., Chertkov,O., Lapidus,A., Lucas,S., Nolan,M., Del Rio,T.G., Tice,H., Cheng,J.F., Pitluck,S., Liolios,K., Ivanova,N., Tapia,R., Han,C., Bruce,D., Goodwin,L., Pati,A., Chen,A., Palaniappan,K., Land,M., Hauser,L., Chang,Y.J., Jeffries,C.D., Detter,J.C., Rohde,M., Brambilla,E., Spring,S., Göker,M., Sikorski,J., Woyke,T., Bristow,J., Eisen,J.A., Markowitz,V., Hugenholtz,P., Klenk,H.P., & Kyrpides,N.C. (2010) Complete genome sequence of *Spirochaeta smaragdinae* type strain (SEBR 4228). *Standards in Genomic Sciences* **3**, 136-144.
- Moeller,R., Rohde,M., & Reitz,G. (2010) Effects of ionizing radiation on the survival of bacterial spores in artificial martian regolith. *Icarus - International Journal of Solar System Studies* **206**, 783-786.
- Nolan,M., Sikorski,J., Davenport,K., Lucas,S., Del Rio,T.G., Tice,H., Cheng,J.F., Goodwin,L., Pitluck,S., Liolios,K., Ivanova,N., Mavromatis,K., Ovchinnikova,G., Pati,A., Chen,A., Palaniappan,K., Land,M., Hauser,L., Chang,Y.J., Jeffries,C.D., Tapia,R., Brettin,T., Detter,J.C., Han,C., Yasawong,M., Rohde,M., Tindall,B.J., Göker,M., Woyke,T., Bristow,J., Eisen,J.A., Markowitz,V., Hugenholtz,P., Kyrpides,N.C., Klenk,H.P., & Lapidus,A. (2010) Complete genome sequence of *Ferrimonas balearica* type strain (PAT). *Standards in Genomic Sciences* **3**, 174-182.
- Nolan,M., Sikorski,J., Jando,M., Lucas,S., Lapidus,A., Glavina Del,R.T., Chen,F., Tice,H., Pitluck,S., Cheng,J.F., Chertkov,O., Sims,D., Meincke,L., Brettin,T., Han,C., Detter,J.C., Bruce,D., Goodwin,L., Land,M., Hauser,L., Chang,Y.J., Jeffries,C.D., Ivanova,N., Mavromatis,K., Mikhailova,N., Chen,A., Palaniappan,K., Chain,P., Rohde,M., Göker,M., Bristow,J., Eisen,J.A., Markowitz,V., Hugenholtz,P., Kyrpides,N.C., & Klenk,H.P. (2010) Complete genome sequence of *Streptosporangium roseum* type strain (NI 9100). *Standard in Genomic Sciences* **2**, 29-37.
- Pati,A., Gronow,S., Lapidus,A., Copeland,A., Glavina Del,R.T., Nolan,M., Lucas,S., Tice,H., Cheng,J.F., Han,C., Chertkov,O., Bruce,D., Tapia,R., Goodwin,L., Pitluck,S., Liolios,K., Ivanova,N., Mavromatis,K., Chen,A., Palaniappan,K., Land,M., Hauser,L., Chang,Y.J., Jeffries,C.D., Detter,J.C., Rohde,M., Göker,M., Bristow,J., Eisen,J.A., Markowitz,V., Hugenholtz,P., Klenk,H.P., & Kyrpides,N.C. (2010) Complete genome sequence of *Arcobacter nitrofigilis* type strain (CI). *Standards in Genomic Sciences* **2**, 300-308.
- Pati,A., Sikorski,J., Gronow,S., Munk,C., Lapidus,A., Copeland,A., Glavina Del,T.T., Nolan,M., Lucas,S., Chen,F., Tice,H., Cheng,J.F., Han,C., Detter,J.C., Bruce,D., Tapia,R., Goodwin,L., Pitluck,S., Liolios,K., Ivanova,N., Mavromatis,K., Mikhailova,N., Chen,A., Palaniappan,K., Land,M., Hauser,L., Chang,Y.J., Jeffries,C.D., Spring,S., Rohde,M., Göker,M., Bristow,J., Eisen,J.A., Markowitz,V., Hugenholtz,P., Kyrpides,N.C., & Klenk,H.P. (2010) Complete genome sequence of *Brachyspira murdochii* type strain (56-150). *Standards in Genomic Sciences* **2**, 260-269.
- Pati,A., Labutti,K., Pukall,R., Nolan,M., Glavina Del,R.T., Tice,H., Cheng,J.F., Lucas,S., Chen,F., Copeland,A., Ivanova,N., Mavromatis,K., Mikhailova,N., Pitluck,S., Bruce,D., Goodwin,L., Land,M., Hauser,L., Chang,Y.J., Jeffries,C.D., Chen,A., Palaniappan,K., Chain,P., Brettin,T., Sikorski,J., Rohde,M., Göker,M., Bristow,J., Eisen,J.A., Markowitz,V., Hugenholtz,P., Kyrpides,N.C., Klenk,H.P., & Lapidus,A. (2010) Complete genome sequence of *Sphaerobacter thermophilus* type strain (S 6022). *Standards in Genomic Sciences* **2**, 49-56.

- Pitluck,S., Yasawong,M., Munk,C., Nolan,M., Lapidus,A., Lucas,S., Glavina Del,R.T., Tice,H., Cheng,J.F., Bruce,D., Detter,C., Tapia,R., Han,C., Goodwin,L., Liolios,K., Ivanova,N., Mavromatis,K., Mikhailova,N., Pati,A., Chen,A., Palaniappan,K., Land,M., Hauser,L., Chang,Y.J., Jeffries,C.D., Rohde,M., Spring,S., Sikorski,J., Göker,M., Woyke,T., Bristow,J., Eisen,J.A., Markowitz,V., Hugenholtz,P., Kyrpides,N.C., & Klenk,H.P. (2010) Complete genome sequence of *Thermosediminibacter oceani* type strain (JW/IW-1228P). *Standards in Genomic Sciences* **3**, 108-116.
- Pitluck,S., Yasawong,M., Held,B., Lapidus,A., Nolan,M., Copeland,A., Lucas,S., Del Rio,T.G., Tice,H., Cheng,J.F., Chertkov,O., Goodwin,L., Tapia,R., Han,C., Liolios,K., Ivanova,N., Mavromatis,K., Ovchinnikova,G., Pati,A., Chen,A., Palaniappan,K., Land,M., Hauser,L., Chang,Y.J., Jeffries,C.D., Pukall,R., Spring,S., Rohde,M., Sikorski,J., Göker,M., Woyke,T., Bristow,J., Eisen,J.A., Markowitz,V., Hugenholtz,P., Kyrpides,N.C., & Klenk,H.P. (2010) Non-contiguous finished genome sequence of *Aminomonas paucivorans* type strain (GLU-3). *Standards in Genomic Sciences* **3**, 285-293.
- Pukall,R., Lapidus,A., Glavina Del,R.T., Copeland,A., Tice,H., Cheng,J.F., Lucas,S., Chen,F., Nolan,M., Labutti,K., Pati,A., Ivanova,N., Mavromatis,K., Mikhailova,N., Pitluck,S., Bruce,D., Goodwin,L., Land,M., Hauser,L., Chang,Y.J., Jeffries,C.D., Chen,A., Palaniappan,K., Chain,P., Rohde,M., Göker,M., Bristow,J., Eisen,J.A., Markowitz,V., Hugenholtz,P., Kyrpides,N.C., Klenk,H.P., & Brettin,T. (2010) Complete genome sequence of *Kribbella flavida* type strain (IFO 14399). *Standards in Genomic Sciences* **2**, 186-193.
- Pukall,R., Lapidus,A., Glavina Del,R.T., Copeland,A., Tice,H., Cheng,J.F., Lucas,S., Chen,F., Nolan,M., Bruce,D., Goodwin,L., Pitluck,S., Mavromatis,K., Ivanova,N., Ovchinnikova,G., Pati,A., Chen,A., Palaniappan,K., Land,M., Hauser,L., Chang,Y.J., Jeffries,C.D., Chain,P., Meincke,L., Sims,D., Brettin,T., Detter,J.C., Rohde,M., Göker,M., Bristow,J., Eisen,J.A., Markowitz,V., Kyrpides,N.C., Klenk,H.P., & Hugenholtz,P. (2010) Complete genome sequence of *Conexibacter woesei* type strain (ID131577). *Standards in Genomic Sciences* **2**, 212-219.
- Reißmann,S., Friedrichs,C., Rajkumari,R., Itzek,A., Fulde,M., Rodloff,A.C., Brahmadrath,K.N., Chhatwal,G.S.*., & Nitsche-Schmitz,D.P. (2010) Contribution of *Streptococcus anginosus* to infections caused by groups C and G Streptococci, Southern India. *Emerging Infectious Diseases* **16**, 656-663.
- Rohde,M., Graham,R.M., Branitzki-Heinemann,K., Borchers,P., Preuss,C., Schleicher,I., Zahner,D., Talay,S.R., Fulde,M., Dinkla,K., & Chhatwal,G.S.*. (2010) Differences in the aromatic domain of homologous streptococcal fibronectin-binding proteins trigger different cell invasion mechanisms and survival rates. *Cellular Microbiology* **13**, 450-468.
- Saunders,E., Tindall,B.J., Fahnrich,R., Lapidus,A., Copeland,A., Del Rio,T.G., Lucas,S., Chen,F., Tice,H., Cheng,J.F., Han,C., Detter,J.C., Bruce,D., Goodwin,L., Chain,P., Pitluck,S., Pati,A., Ivanova,N., Mavromatis,K., Chen,A., Palaniappan,K., Land,M., Hauser,L., Chang,Y.J., Jeffries,C.D., Brettin,T., Rohde,M., Göker,M., Bristow,J., Eisen,J.A., Markowitz,V., Hugenholtz,P., Klenk,H.P., & Kyrpides,N.C. (2010) Complete genome sequence of *Haloterrigena turkmenica* type strain (4k). *Standards in Genomic Sciences* **2**, 107-116.
- Sikorski,J., Chertkov,O., Lapidus,A., Nolan,M., Lucas,S., Del Rio,T.G., Tice,H., Cheng,J.F., Tapia,R., Han,C., Goodwin,L., Pitluck,S., Liolios,K., Ivanova,N., Mavromatis,K., Mikhailova,N., Pati,A., Chen,A., Palaniappan,K., Land,M., Hauser,L., Chang,Y.J., Jeffries,C.D., Brambilla,E., Yasawong,M., Rohde,M., Pukall,R., Spring,S., Göker,M., Woyke,T., Bristow,J., Eisen,J.A., Markowitz,V., Hugenholtz,P., Kyrpides,N.C., & Klenk,H.P. (2010) Complete genome sequence of *Ilyobacter polytropus* type strain (CuHbu1). *Standards in Genomic Sciences* **3**, 304-314.
- Sikorski,J., Lapidus,A., Chertkov,O., Lucas,S., Copeland,A., Glavina Del,R.T., Nolan,M., Tice,H., Cheng,J.F., Han,C., Brambilla,E., Pitluck,S., Liolios,K., Ivanova,N., Mavromatis,K., Mikhailova,N., Pati,A., Bruce,D., Detter,C., Tapia,R., Goodwin,L., Chen,A., Palaniappan,K., Land,M., Hauser,L., Chang,Y.J., Jeffries,C.D., Rohde,M., Göker,M., Spring,S., Woyke,T., Bristow,J., Eisen,J.A., Markowitz,V., Hugenholtz,P., Kyrpides,N.C., & Klenk,H.P. (2010) Complete genome sequence of *Acetohalobium arabaticum* type strain (Z-7288). *Standards in Genomic Sciences* **3**, 57-65.
- Sikorski,J., Lapidus,A., Copeland,A., Glavina Del,R.T., Nolan,M., Lucas,S., Chen,F., Tice,H., Cheng,J.F., Saunders,E., Bruce,D., Goodwin,L., Pitluck,S., Ovchinnikova,G., Pati,A., Ivanova,N., Mavromatis,K., Chen,A., Palaniappan,K., Chain,P., Land,M., Hauser,L., Chang,Y.J., Jeffries,C.D., Brettin,T., Detter,J.C., Han,C., Rohde,M., Lang,E., Spring,S., Göker,M., Bristow,J., Eisen,J.A., Markowitz,V., Hugenholtz,P., Kyrpides,N.C., & Klenk,H.P. (2010) Complete genome sequence of *Sulfurospirillum deleyianum* type strain (5175). *Standards in Genomic Sciences* **2**, 149-157.
- Sikorski,J., Munk,C., Lapidus,A., Ngatchou Djao,O.D., Lucas,S., Glavina Del,R.T., Nolan,M., Tice,H., Han,C., Cheng,J.F., Tapia,R., Goodwin,L., Pitluck,S., Liolios,K., Ivanova,N., Mavromatis,K., Mikhailova,N., Pati,A., Sims,D., Meincke,L., Brettin,T., Detter,J.C., Chen,A., Palaniappan,K., Land,M., Hauser,L., Chang,Y.J., Jeffries,C.D., Rohde,M., Lang,E., Spring,S., Göker,M., Woyke,T., Bristow,J., Eisen,J.A., Markowitz,V., Hugenholtz,P., Kyrpides,N.C., & Klenk,H.P. (2010) Complete genome sequence of *Sulfurimonas autotrophica* type strain (OK10). *Standards in Genomic Sciences* **3**, 194-202.
- Sikorski,J., Tindall,B.J., Lowry,S., Lucas,S., Nolan,M., Copeland,A., Glavina Del,R.T., Tice,H., Cheng,J.F., Han,C., Pitluck,S., Liolios,K., Ivanova,N., Mavromatis,K., Mikhailova,N., Pati,A., Goodwin,L., Chen,A., Palaniappan,K., Land,M., Hauser,L., Chang,Y.J., Jeffries,C.D., Rohde,M., Göker,M., Woyke,T., Bristow,J., Eisen,J.A., Markowitz,V., Hugenholtz,P., Kyrpides,N.C., & Lapidus,A. (2010) Complete genome sequence of *Meiothermus silvanus* type strain (VI-R2). *Standards in Genomic Sciences* **3**, 37-46.
- Sikorski,J., Lapidus,A., Copeland,A., Misra,M., Glavina Del,R.T., Nolan,M., Lucas,S., Chen,F., Tice,H., Cheng,J.F., Jando,M., Schneider,S., Bruce,D., Goodwin,L., Pitluck,S., Liolios,K., Mikhailova,N., Pati,A., Ivanova,N., Mavromatis,K., Chen,A., Palaniappan,K., Chertkov,O., Land,M., Hauser,L., Chang,Y.J., Jeffries,C.D., Brettin,T., Detter,J.C., Han,C., Rohde,M., Göker,M., Bristow,J., Eisen,J.A., Markowitz,V., Hugenholtz,P., Kyrpides,N.C., & Klenk,H.P. (2010) Complete genome sequence of *Segniliparus rotundus* type strain (CDC 1076). *Standards in Genomic Sciences* **2**, 203-211.
- Spring,S., Nolan,M., Lapidus,A., Glavina Del,R.T., Copeland,A., Tice,H., Cheng,J.F., Lucas,S., Land,M., Chen,F., Bruce,D., Goodwin,L., Pitluck,S., Ivanova,N., Mavromatis,K., Mikhailova,N., Pati,A., Chen,A., Palaniappan,K., Hauser,L., Chang,Y.J., Jeffries,C.D., Munk,C., Kiss,H., Chain,P., Han,C., Brettin,T., Detter,J.C., Schuler,E., Göker,M., Rohde,M., Bristow,J., Eisen,J.A., Markowitz,V., Hugenholtz,P., Kyrpides,N.C., & Klenk,H.P. (2010) Complete genome sequence of *Desulfohalobium retbaense* type strain (HR(100)). *Standards in Genomic Sciences* **2**, 38-48.
- Spring,S., Scheuner,C., Lapidus,A., Lucas,S., Glavina Del,R.T., Tice,H., Copeland,A., Cheng,J.F., Chen,F., Nolan,M., Saunders,E., Pitluck,S., Liolios,K., Ivanova,N., Mavromatis,K., Lykidis,A., Pati,A., Chen,A., Palaniappan,K., Land,M., Hauser,L., Chang,Y.J., Jeffries,C.D., Goodwin,L., Detter,J.C., Brettin,T., Rohde,M., Göker,M., Woyke,T., Bristow,J., Eisen,J.A., Markowitz,V., Hugenholtz,P., Kyrpides,N.C., & Klenk,H.P. (2010) The Genome Sequence of *Methanohalophilus mahii* SLP Reveals Differences in the Energy Metabolism among Members of the *Methanosarcinaceae* Inhabiting Freshwater and Saline Environments. *Archaea* **2010**, 690737.
- Sun,H., Spring,S., Lapidus,A., Davenport,K., Del Rio,T.G., Tice,H., Nolan,M., Copeland,A., Cheng,J.F., Lucas,S., Tapia,R., Goodwin,L., Pitluck,S., Ivanova,N., Pagani,I., Mavromatis,K., Ovchinnikova,G., Pati,A., Chen,A., Palaniappan,K., Hauser,L., Chang,Y.J., Jeffries,C.D., Detter,J.C., Han,C., Rohde,M., Brambilla,E., Göker,M., Woyke,T., Bristow,J., Eisen,J.A., Markowitz,V., Hugenholtz,P., Kyrpides,N.C., Klenk,H.P., & Land,M. (2010) Complete genome sequence of *Desulfarculus baarsii* type strain (2st14). *Standards in Genomic Sciences* **3**, 276-284.
- Sun,H., Lapidus,A., Nolan,M., Lucas,S., Del Rio,T.G., Tice,H., Cheng,J.F., Tapia,R., Han,C., Goodwin,L., Pitluck,S., Pagani,I., Ivanova,N., Mavromatis,K., Mikhailova,N., Pati,A., Chen,A., Palaniappan,K., Land,M., Hauser,L., Chang,Y.J., Jeffries,C.D., Djao,O.D., Rohde,M., Sikorski,J., Göker,M., Woyke,T., Bristow,J., Eisen,J.A., Markowitz,V., Hugenholtz,P., Kyrpides,N.C., & Klenk,H.P. (2010) Complete genome sequence of *Nocardiosis dassonvillei* type strain (IMRU 509). *Standards in Genomic Sciences* **3**, 325-336.

- Tegtmeyer,N., Hartig,R., Delahay,R.M., Rohde,M., Brandt,S., Conradi,J., Takahashi,S., Smolka,A.J., Sewald,N., & Backert,S. (2010) A small fibronectin-mimicking protein from bacteria induces cell spreading and focal adhesion formation. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 23515-23526.
 - Tice,H., Mayilraj,S., Sims,D., Lapidus,A., Nolan,M., Lucas,S., Glavina Del,R.T., Copeland,A., Cheng,J.F., Meincke,L., Bruce,D., Goodwin,L., Pitluck,S., Ivanova,N., Mavromatis,K., Ovchinnikova,G., Pati,A., Chen,A., Palaniappan,K., Land,M., Hauser,L., Chang,Y.J., Jeffries,C.D., Detter,J.C., Brettin,T., Rohde,M., Goker,M., Bristow,J., Eisen,J.A., Markowitz,V., Hugenholtz,P., Kyrpides,N.C., Klenk,H.P., & Chen,F. (2010) Complete genome sequence of *Nakamurella multipartita* type strain (Y-104). *Standards in Genomic Sciences* **2**, 168-175.
 - Tindall,B.J., Sikorski,J., Lucas,S., Goltsman,E., Copeland,A., Glavina Del,R.T., Nolan,M., Tice,H., Cheng,J.F., Han,C., Pitluck,S., Liolios,K., Ivanova,N., Mavromatis,K., Ovchinnikova,G., Pati,A., Fahrnich,R., Goodwin,L., Chen,A., Palaniappan,K., Land,M., Hauser,L., Chang,Y.J., Jeffries,C.D., Rohde,M., Göker,M., Woyke,T., Bristow,J., Eisen,J.A., Markowitz,V., Hugenholtz,P., Kyrpides,N.C., Klenk,H.P., & Lapidus,A. (2010) Complete genome sequence of *Meiothermus ruber* type strain (21). *Standards in Genomic Sciences* **3**, 26-36.
 - Traverso,F.R., Bohr,U.R.M., Oyarzabal,O.A., Rohde,M., Clarici,A., Wex,T., Kuester,D., Malfertheiner,P., Fox,J.G., & Backert,S. (2010) Morphologic, genetic, and biochemical characterization of *Helicobacter magdeburgensis*, a novel species isolated from the intestine of laboratory mice. *Helicobacter* **15**, 403-415.
 - von Jan,M., Lapidus,A., Del Rio,T.G., Copeland,A., Tice,H., Cheng,J.F., Lucas,S., Chen,F., Nolan,M., Goodwin,L., Han,C., Pitluck,S., Liolios,K., Ivanova,N., Mavromatis,K., Ovchinnikova,G., Chertkov,O., Pati,A., Chen,A., Palaniappan,K., Land,M., Hauser,L., Chang,Y.J., Jeffries,C.D., Saunders,E., Brettin,T., Detter,J.C., Chain,P., Eichinger,K., Huber,H., Spring,S., Rohde,M., Göker,M., Wirth,R., Woyke,T., Bristow,J., Eisen,J.A., Markowitz,V., Hugenholtz,P., Kyrpides,N.C., & Klenk,H.P. (2010) Complete genome sequence of *Archaeoglobus profundus* type strain (AV18). *Standards in Genomic Sciences* **2**, 327-346.
 - Wirth,R., Sikorski,J., Brambilla,E., Misra,M., Lapidus,A., Copeland,A., Nolan,M., Lucas,S., Chen,F., Tice,H., Cheng,J.F., Han,C., Detter,J.C., Tapia,R., Bruce,D., Goodwin,L., Pitluck,S., Pati,A., Anderson,I., Ivanova,N., Mavromatis,K., Mikhailova,N., Chen,A., Palaniappan,K., Bilek,Y., Hader,T., Land,M., Hauser,L., Chang,Y.J., Jeffries,C.D., Tindall,B.J., Rohde,M., Göker,M., Bristow,J., Eisen,J.A., Markowitz,V., Hugenholtz,P., Kyrpides,N.C., & Klenk,H.P. (2010) Complete genome sequence of *Thermocrinis albus* type strain (HI 11/12). *Standards in Genomic Sciences* **2**, 194-202.
 - Yasawong,M., Teshima,H., Lapidus,A., Nolan,M., Lucas,S., Glavina Del,R.T., Tice,H., Cheng,J.F., Bruce,D., Detter,C., Tapia,R., Han,C., Goodwin,L., Pitluck,S., Liolios,K., Ivanova,N., Mavromatis,K., Mikhailova,N., Pati,A., Chen,A., Palaniappan,K., Land,M., Hauser,L., Chang,Y.J., Jeffries,C.D., Rohde,M., Sikorski,J., Pukall,R., Göker,M., Woyke,T., Bristow,J., Eisen,J.A., Markowitz,V., Hugenholtz,P., Kyrpides,N.C., & Klenk,H.P. (2010) Complete genome sequence of *Arcanobacterium haemolyticum* type strain (11018). *Standards in Genomic Sciences* **3**, 126-135.
 - Bergmann,R., Dinkla,K., Nitsche-Schmitz,D.P., Graham,R.M., Luttmann,M., Sanderson-Smith,M.L., Nerlich,A., Rohde,M., & Chhatwal,G.S.*. (2011) Biological functions of GCS3, a novel plasminogen-binding protein of *Streptococcus dysgalactiae* ssp. equisimilis. *International Journal of Medical Microbiology* **301**, 157-164.
 - Fulde,M., Rohde,M., Hitzmann,A., Preissner,K.T., Nitsche-Schmitz,D.P., Nerlich,A., Chhatwal,G.S.*., & Bergmann,S. (2011) SCM, a novel M-like protein from *Streptococcus canis*, binds (mini)-plasminogen with high affinity and facilitates bacterial transmigration. *Biochemical Journal* **434**, 523-535.
 - Härtel,T., Klein,M., Koedel,U., Rohde,M., Petruschka,L., & Hammerschmidt,S. (2011) Impact of glutamine transporters on pneumococcal fitness under infection-related conditions. *Infection and Immunity* **79**, 44-58.
 - Lyszkiewicz,M., Zietara,N., Rohde,M., Gekara,N.O., Jablonska,J., Dittmar,K.E.*., & Weiss,S. (2011) SIGN-R1+MHC II+ cells of the splenic marginal zone—a novel type of resident dendritic cells. *Journal of Leukocyte Biology* **89**, 607-615.
 - Gupta,A.K., Dharne,M.S., Rangrez,A.Y., Verma,P., Ghate,H.V., Rohde,M., Patole,M.S., & Shouche,Y.S. (2010) *Ignatzschineria indica* sp. nov. and *Ignatzschineria ureaclastica* sp. nov., isolated from adult flesh fly (Diptera: Sarcophagidae). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, in press.
 - von Jan,M., Rieger,N., Potter,G., Schumann,P., Verbarq,S., Sproer,C., Rohde,M., Lauer,B., Labeda,D.P., & Klenk,H.P. (2010) *Kroppenstedtia eburnea* gen. nov., sp. nov., a novel thermoactinomycete isolated by environmental screening, and emended description of the family *Thermoactinomycetaceae* Matsuo et al. 2006 emend. Yassin et al. 2009. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, in press.
 - Abel,J., Goldmann,O., Ziegler,C., Höltje,C., Smeltzer,M.S., Cheung,A.L., Bruhn,D., Rohde,M., & Medina,E. (2011) *Staphylococcus aureus* evades the extracellular antimicrobial activity of mast cells by promoting its own uptake. *Journal of Innate Immunity*, in press.
 - Hebecker,S., Arendt,W., Heinemann,I.U., Tiefenau,J.H., Nitzm,M., Rohde,M., Soll,D., & Moser,J. (2011) Alanyl-phosphatidylglycerol synthase: mechanism of substrate recognition during tRNA-dependent lipid modification in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, in press.
 - Willenborg,J., Fulde,M., de,G.A., Rohde,M., Smith,H.E., Valentin-Weigand,P., & Goethe,R. (2011) Role of glucose and CcpA in capsule expression and virulence of *Streptococcus suis*. *Microbiology*, in press.
- AG Infektionsimmunologie | Priv.-Doz. Dr. Eva Medina**
- Goldmann,O., Lehne,S., & Medina,E. (2010) Age-related susceptibility to *Streptococcus pyogenes* infection in mice: underlying immune dysfunction and strategy to enhance immunity. *Journal of Pathology* **220**, 521-529.
 - Goldmann,O., Herten,E., Hecht,A., Schmidt,H., Lehne,S., Norrby-Teglund,A., & Medina,E. (2010) Inducible cyclooxygenase released prostaglandin E2 modulates the severity of infection caused by *Streptococcus pyogenes*. *Journal of Immunology* **185**, 2372-2381.
 - Loof,T.G., Goldmann,O., Gessner,A., Herwald,H., & Medina,E. (2010) Aberrant inflammatory response to *Streptococcus pyogenes* in mice lacking myeloid differentiation factor 88. *American Journal of Pathology* **176**, 754-763.
 - Medina,E. & Goldmann,O. (2011) *In vivo* and *ex vivo* protocols for measuring the killing of extracellular pathogens by macrophages. *Current Protocols in Immunology Chapter* **14**, Unit14.19.
 - Medina,E. (2010) Murine model of cutaneous infection with *Streptococcus pyogenes*. *Methods in Molecular Biology* **602**, 395-403.
 - Medina,E. (2010) Murine model of pneumococcal pneumonia. *Methods in Molecular Biology* **602**, 405-410.
 - Medina,E. (2010) Murine model of polymicrobial septic peritonitis using cecal ligation and puncture (CLP). *Methods in Molecular Biology* **602**, 411-415.
 - Nippe,N., Varga,G., Holzinger,D., Löffler,B., Medina,E., Becker,K., Roth,J., Ehrchen,J.M., & Sunderkotter,C. (2010) Subcutaneous infection with *S. aureus* in mice reveals association of resistance with influx of neutrophils and Th2 response. *Journal of Investigative Dermatology* **131**, 125-132.
 - Tuchscher,L., Medina,E., Hussain,M., Volker,W., Heitmann,V., Niemann,S., Holzinger,D., Roth,J., Proctor,R.A., Becker,K., Peters,G., & Löffler,B. (2011) *Staphylococcus aureus* phenotype switching: an effective bacterial strategy to escape host immune response and establish a chronic infection. *EMBO Molecular Medicine* **3**, 129-141.

- Medina, E. (2011) Novel experimental models for dissecting genetic susceptibility of superantigen-mediated diseases. In: Superantigens: Molecular Basis for Their Role in Human Disease (Kotb, M. & Frase, J.D., eds.), ASM Press, Washington, D.C., in press.
 - Abel, J., Goldmann, O., Ziegler, C., Höltje, C., Smeltzer, M.S., Cheung, A.L., Bruhn, D., Rohde, M., & Medina, E. (2011) *Staphylococcus aureus* evades the extracellular antimicrobial activity of mast cells by promoting its own uptake. *Journal of Innate Immunity*, in press.
- AG Mikrobielle Interaktionen und Prozesse | Prof. Dr. Dietmar Pieper**
- Gomes, N.C., Flocco, C.G., Costa, R., Junca, H., Vilchez, R., Pieper, D.H. *, Krogerrecklenfort, E., Paranhos, R., Mendonca-Hagler, L.C., & Smalla, K. (2010) Mangrove microniches determine the structural and functional diversity of enriched petroleum hydrocarbon-degrading consortia. *FEMS Microbiology Ecology* **74**, 276-290.
 - Marin, M., Perez-Pantoja, D., Donoso, R., Wray, V., Gonzalez, B., & Pieper, D.H. *. (2010) Modified 3-oxoadipate pathway for the biodegradation of methylaromatics in *Pseudomonas reinekei* MT1. *Journal of Bacteriology* **192**, 1543-1552.
 - Vilchez-Vargas, R., Junca, H., & Pieper, D.H. *. (2010) Metabolic networks, microbial ecology and 'omics' technologies: towards understanding *in situ* biodegradation processes. *Environmental Microbiology* **12**, 3089-3104.
 - Wos-Oxley, M.L., Plumeier, I., von, E.C., Taudien, S., Platzer, M., Vilchez-Vargas, R., Becker, K., & Pieper, D.H. *. (2010) A poke into the diversity and associations within human anterior nare microbial communities. *ISME Journal* **4**, 839-851.
 - Junca, H. & Pieper, D.H. *. (2011) Functional marker gene assays for hydrocarbon degrading microbial communities - aerobic. In: Handbook of Hydrocarbon Microbiology (Timmis, K.N., ed.), Springer, in press.
 - Palleroni, N., Pieper, D.H. *, & Moore, E.R.B. (2011) Microbiology of hydrocarbon-degrading *Pseudomonas*. In: Handbook of Hydrocarbon Microbiology (Timmis, K.N., ed.), Springer, in press.
 - Perez-Pantoja, D., Gonzalez, B., & Pieper, D.H. *. (2011) Aerobic degradation of aromatic hydrocarbons. In: Handbook of Hydrocarbon Microbiology (Timmis, K.N., ed.), Springer, in press.
 - Pieper, D.H. *, Gonzalez, B., Camara, B., Perez-Pantoja, D., & Reineke, W. (2011) Aerobic degradation of chloroaromatics. In: Handbook of Hydrocarbon Microbiology (Timmis, K.N., ed.), Springer, in press.
 - Seeger, M. & Pieper, D.H. *. (2011) Genetics of biphenyl biodegradation and co-metabolism of PCBs. In: Handbook of Hydrocarbon Microbiology (Timmis, K.N., ed.), Springer, in press.
 - Becker, K., Mutter, W., Daniel, R., Rudack, C., Peschel, A., & Pieper, D. (2011) Bakterielle Untermieter in der menschlichen Nase. *GenomX-Press*, in press.
 - Pflingsten-Würzburg, S., Pieper, D., Bautsch, W., & Probst-Kepper, M. (2011) Prevalence and molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in nursing home residents in northern Germany. *Journal of Hospital Infection*, in press.
 - Vilchez, R., Gomez-Silvan, C., Purswani, J., Gonzalez-Lopez, J., & Rodelas, B. (2011) Characterization of bacterial communities exposed to Cr(III) and Pb(II) in submerged fixed-bed biofilms for groundwater treatment. *Ecotoxicology*, in press.
- Abt. für Vakzinologie und Angewandte Mikrobiologie | Prof. Dr. Carlos Guzmán**
- Becker, P.D., Royo, J.L., & Guzmán, C.A. * (2010) Exploitation of prokaryotic expression systems based on the salicylate-dependent control circuit encompassing nahRPsal::xyIS2 for biotechnological applications. *Bioengineered Bugs* **1**, 246-253.
 - Becker, P.D., Legrand, N., van Geelen, C.M., Noerder, M., Huntington, N.D., Lim, A., Yasuda, E., Diehl, S.A., Scheeren, F.A., Ott, M., Weijer, K., Wedemeyer, H., Di Santo, J.P., Beaumont, T., Guzmán, C.A. *, & Spits, H. (2010) Generation of human antigen-specific monoclonal IgM antibodies using vaccinated "human immune system" mice. *PLoS ONE* **5**.
 - Bjorkstrom, N.K., Riese, P., Heuts, F., Andersson, S., Fauriat, C., Ivarsson, M.A., Bjorklund, A.T., Flodstrom-Tullberg, M., Michaelsson, J., Rottenberg, M.E., Guzmán, C.A. *, Ljunggren, H.G., & Malmberg, K.J. (2010) Expression patterns of NKG2A, KIR, and CD57 define a process of CD56dim NK-cell differentiation uncoupled from NK-cell education. *Blood* **116**, 3853-3864.
 - Caro-Quintero, A., Deng, J., Auchtung, J., Brettar, I., Höfle, M.G. *, Klappenbach, J., & Konstantinidis, K.T. (2010) Unprecedented levels of horizontal gene transfer among spatially co-occurring *Shewanella* bacteria from the Baltic Sea. *ISME Journal* **5**, 140.
 - Cazorla, S.I., Frank, F.M., Becker, P.D., Arnaiz, M., Mirkin, G.A., Corral, R.S., Guzmán, C.A. *, & Malchioldi, E.L. (2010) Redirection of the immune response to the functional catalytic domain of the cysteine proteinase cruzipain improves protective immunity against *Trypanosoma cruzi* infection. *Journal of Infectious Diseases* **202**, 136-144.
 - Chen, H.L., Lünsdorf, H., Hecht, H.J., & Tsai, H. (2010) Porcine pulmonary angiotensin I-converting enzyme-biochemical characterization and spatial arrangement of the N- and C-domains by three-dimensional electron microscopic reconstruction. *Micron* **41**, 674-685.
 - Ebensen, T., Libanova, R., & Guzman, C.A. * (2010) Bis-(3',5')-cyclic di-GMP: promising adjuvant for vaccine design. In The Second Messenger Cyclic di-GMP (Wolf, A.J. & Visick, K.L.L., eds), pp. 311-319. ASM Press, Washington, D.C., USA.
 - Fritzer, A., Senn, B.M., Minh, D.B., Hanner, M., Gelbmann, D., Noiges, B., Henics, T., Schulze, K., Guzmán, C.A. *, Goodacre, J., von, G.A., Nagy, E., & Meinke, A.L. (2010) Novel conserved group A streptococcal proteins identified by the antigenome technology as vaccine candidates for a non-M protein-based vaccine. *Infection and Immunity* **78**, 4051-4067.
 - Guzmán, C.A. *. (2010) Research needs in vaccinology. In: Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology (Timmis, K.N., ed.), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 3383-3385.
 - Guzmán, C.A. * (2010) Optimizing rational vaccine design. *Microbial Biotechnology* **2**, 136-138.
 - Hahn, M.W., Lang, E., Brandt, U., Lünsdorf, H., Wu, Q.L., & Stackebrandt, E. (2010) *Polynucleobacter cosmopolitanus* sp. nov., free-living planktonic bacteria inhabiting freshwater lakes and rivers. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **60**, 166-173.
 - Kahlisch, L., Henne, K., Draheim, J., Brettar, I., & Höfle, M.G. * (2010) High-resolution *in situ* genotyping of *Legionella pneumophila* populations in drinking water by multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis using environmental DNA. *Applied and Environmental Microbiology* **76**, 6186-6195.
 - Kahlisch, L., Henne, K., Gröbe, L., Draheim, J., Höfle, M.G. *, & Brettar, I. (2010) Molecular analysis of the bacterial drinking water community with respect to live/dead status. *Water Science and Technology* **61**, 9-14.
 - Knothe, S., Mutschler, V., Rochlitzer, S., Winkler, C., Ebensen, T., Guzmán, C.A. *, Hohlfeld, J., Braun, A., & Muller, M. (2010) Local treatment with BPPcysMPEG reduces allergic airway inflammation in sensitized mice. *Immunobiology* **216**, 110-117.
 - Libanova, R., Ebensen, T., Schulze, K., Bruhn, D., Nörder, M., Yevsa, T., Morr, M., & Guzmán, C.A. * (2010) Corrigendum to "The member of the cyclic di-nucleotide family bis-(3',5')-cyclic dimeric inosine monophosphate exerts potent activity as mucosal adjuvant [Vaccine 28 (2010) 2249-2258]. *Vaccine* **28**, 3625.

- Libanova,R., Ebensen,T., Schulze,K., Bruhn,D., Norder,M., Yevsa,T., Morr,M., & Guzmán,C.A.* (2010) The member of the cyclic di-nucleotide family bis-(3', 5')-cyclic dimeric inosine monophosphate exerts potent activity as mucosal adjuvant. *Vaccine* **28**, 2249-2258.
- Nörder,M., Becker,P.D., Drexler,I., Link,C., Erfle,V., & Guzmán,C.A.* (2010) Modified vaccinia virus Ankara exerts potent immune modulatory activities in a murine model. *PLoS ONE* **5**, e11400.
- Prajeeth,C.K., Jirmo,A.C., Krishnaswamy,J.K., Ebensen,T., Guzmán,C.A.* , Weiss,S., Constabel,H., Schmidt,R.E., & Behrens,G.M. (2010) The synthetic TLR2 agonist BPPcysMPEG leads to efficient cross-priming against co-administered and linked antigens. *European Journal of Immunology* **40**, 1272-1283.
- Roming,M., Lünsdorf,H., Dittmar,K.E.* , & Feldmann,C. (2010) ZrO(HPO(4))(1-x)(FMN)(x): quick and easy synthesis of a nanoscale luminescent biomarker. *Angewandte Chemie International Edition* **49**, 632-637.
- Stegmann,K.A., Björkström,N.K., Liermann,H., Ciesek,S., Riese,P., Wiegand,J., Hadem,J., Suneetha,P.V., Jaroszewicz,J., Wang,C., Schlaphoff,V., Fytilli,P., Cornberg,M., Manns,M.P., Geffers,R., Pietschmann,T., Guzmán,C.A.* , Ljunggren,H.-G., & Wedemeyer,H. (2010) IFN alpha-induced TRAIL on human NK cells is associated with control of hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* **138**, 1885-1897.
- Switalla,S., Lauenstein,L., Prenzler,F., Knothe,S., Forster,C., Fieguth,H.G., Pfennig,O., Schaumann,F., Martin,C., Guzmán,C.A.* , Ebensen,T., Muller,M., Hohlfeld,J.M., Krug,N., Braun,A., & Sewald,K. (2010) Natural innate cytokine response to immunomodulators and adjuvants in human precision-cut lung slices. *Toxicology and Applied Pharmacology* **246**, 107-115.
- Ebensen,T., Libanova,R., & Guzmán,C.A.* (2011) Infection prevention: oil- and lipid-containing products in vaccinology. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* (Timmis,K.N., ed), pp. 3311-3331. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Knothe,S., Mutschler,V., Rochlitz,S., Winkler,C., Ebensen,T., Guzmán,C.A.* , Hohlfeld,J., Braun,A., & Muller,M. (2011) Local treatment with BPPcysMPEG reduces allergic airway inflammation in sensitized mice. *Immunobiology* **216**, 110-117.
- Guzmán,C.A.* (2009) Research needs in vaccinology. In: *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology* (Timmis,K.N., ed.), Springer, in press.
- Guzmán,C.A.* & Timmis,K.N.* (2011) Towards intelligent vaccines: the VAC-CHIP. In the "Crystal ball - 2011" section. *Microbial Biotechnology*, in press.
- Huntington,N.D., Alves,N.L., Legrand,N., Lim,A., Strick-Marchand,H., Mention,J.J., Plet,A., Weijer,K., Jacques,Y., Becker,P.D., Guzmán,C.A.* , Soussan,P., Kremendorf,D., Spits,H., & Di Santo,J.P. (2011) IL-15 transpresentation promotes both human T-cell reconstitution and T-cell-dependent antibody responses *in vivo*. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*, in press.
- TrehanPati,N., Sukriti,S., Geffers,R., Hissar,S., Riese,P., Toepfer,T., Buer,J., Adams,D.H., Guzmán,C.A.* , & Sarin,S.K. (2011) Acute and resolving phase of HEV infected patients and its cellular immune and global gene expression patterns. *Journal of Clinical Immunology*, in press.
- Zygmunt,B.M., Gröbe,L., & Guzmán,C.A.* (2011) Peritoneal cavity is dominated by IFN γ -secreting CXCR3+ Th1 cells. *PLOS ONE*, in press.
- Abraham,W.-R., Macedo,A.J., Lünsdorf,H., & Nikitin,D. (2011) Genus V. *Arcicella* Nikitin, Strömpl, Oranskaya and Abraham. 2004, 683VP. (*Arcocella* Nikitin, Oranskaya, Pitryuk, Chernykh and Lysenko. 1994, 152). In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Garrity,G.M., & Ed.of Vol.4: Hedlund,B., Krieg,N.R., Ludwig,W., Paster,B.J., Staley,J.T., Ward,N., & Whitman,W.B., eds.), pp. 377-380.
- Estrela,A.B. & Abraham,W.-R. (2010) *Brevundimonas vancanneytii* sp. nov., isolated from blood of a patient with endocarditis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **60**, 2129-2134.
- Estrela,A.B. & Abraham,W.-R. (2010) Combining biofilm-controlling compounds and antibiotics as a promising new way to control biofilm infections. *Pharmaceuticals* **3**, 1374.
- Estrela,A.B.* , Seixas,A., Teixeira,V.O., Pinto,A.F., & Termignoni,C. (2010) Vitellin- and hemoglobin-digesting enzymes in *Rhhipicephalus (Boophilus)* microplus larvae and females. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology* **157**, 326-335.
- Jakobs-Schonwandt,D., Mathies,H., Abraham,W.-R., Pritzkow,W., Stephan,I., & Noll,M. (2010) Biodegradation of a biocide (Cu-N-cyclohexyldiazonium dioxide) component of a wood preservative by a defined soil bacterial community. *Applied and Environment Microbiology* **76**, 8076-8083.
- Menyailo,O.V., Abraham,W.-R., & Conrad,R. (2010) Tree species affect atmospheric CH₄ oxidation without community composition of soil methanotrophs. *Soil Biology and Biochemistry* **42**, 101-107.
- Stiesch,M., Heuer,W., Kohorst,P., Winkel,A., Stumpp,S.N., Menzel,H., Pfaffenroth,C., Behrens,P., Chichkov,B., & Abraham,W.-R. (2010) Biofilmbildung auf dentalen Implantaten - Biofilm formation on dental implants. *Biomedizinische Technik - Biomedical Engineering* **55**.
- Heuer,W., Stiesch,M., & Abraham,W.-R. (2011) Microbial diversity of supra- and subgingival biofilms on freshly colonized titanium implant abutments in the human mouth. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, in press.
- Abraham,W.-R. (2011) Megacities as sources for pathogenic bacteria in rivers and their fate downstream. *International Journal of Microbiology*, in press.
- Peres de Carvalho,M. & Abraham,W.-R. (2011) Antimicrobial secondary metabolites from fungi for food safety. In: *Natural Antimicrobials for Biosafety and Quality* (Rai,M., ed.), CABI, UK, in press.

NG Phagosomen Biologie | Dr. Maximiliano Gutierrez

- Bleck,C.K., Merz,A., Gutierrez,M.G.* , Walther,P., Dubochet,J., Zuber,B., & Griffiths,G. (2010) Comparison of different methods for thin section EM analysis of *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of Microscopy* **237**, 23-38.
- Gutierrez,M.G.* (2010) Salmonella vacuole maturation: PIKfyve leads the way. *Embo Journal* **29**, 1316-1317.
- Wahe,A., Kasmapour,B., Schmaderer,C., Liebl,D., Sandhoff,K., Nykjaer,A., Griffiths,G., & Gutierrez,M.G.* (2010) Golgi-to-phagosome transport of acid sphingomyelinase and prosaposin is mediated by sortilin. *Journal of Cell Science* **123**, 2502-2511.

NG Immunalterung und Chronische Infektionen | Dr. Dr. Luka Cicin-Sain

AG Chemische Mikrobiologie | Dr. Wolf-Rainer Abraham

- Abraham,W.-R., Estrela,A.B., Nikitin,D.I., Smit,J., & Vancanneyt,M. (2010) *Brevundimonas halotolerans* sp. nov., *Brevundimonas poindexterae* sp. nov. and *Brevundimonas staleyi* sp. nov., prosthecate bacteria from aquatic habitats. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **60**, 1837-1843.
- Cicin-Sain,L., Smyk-Pearson,S., Currier,N., Byrd,L., Koudelka,C., Robinson,T., Swarbrick,G., Tackitt,S., Legasse,A., Fischer,M., Nikolich-Zugich,D., Park,B., Hobbs,T., Doane,C.J., Mori,M., Axthelm,M.K., Lewinsohn,D.A., & Nikolich-Zugich,J. (2010) Loss of naive T cells and repertoire constriction predict poor response to vaccination in old primates. *Journal of Immunology* **184**, 6739-6745.
- Voss,A., Gescher,K., Hensel,A., Nacken,W. & Kerkhoff,C. (2011) Double-Stranded RNA Induces MMP-9 Gene Expression in HaCaT Keratinocytes by Tumor Necrosis Factor- α . *Inflamm Allergy Drug Targets*, in press.

Abt. für Infektionsgenetik | Prof. Dr. Klaus Schughart

- Alberts,R. & Schughart,K. (2010) QTLminer: identifying genes regulating quantitative traits. *BMC Bioinformatics* **11**, 516.
- Alberts,R., Srivastava,B., Wu,H., Viegas,N., Geffers,R., Klawonn,F., Novoselova,N., Zaverucha,d., V, Panthier,J.J. & Schughart,K. (2010) Gene expression changes in the host response between resistant and susceptible inbred mouse strains after influenza A infection. *Microbes and Infection* **12**, 309-318.
- Bertram,S., Glowacka,I., Blazejewska,P., Soilleux,E., Allen,P., Danisch,S., Steffen,I., Choi,S.Y., Park,Y., Schneider,H., Schughart,K. & Pohlmann,S. (2010) TMPRSS2 and TMPRSS4 facilitate trypsin-independent spread of influenza virus in Caco-2 cells. *Journal of Virology* **84**, 10016-10025.
- Bruck,N., Gahr,M. & Pessler,F. (2010) Transient oligoarthritis of the lower extremity following influenza B virus infection: Case report. *Pediatric Rheumatology* **8**, 4.
- Bucher,K., Dietz,K., Lackner,P., Pasche,B., Fendel,R., Mordmuller,B. Ben-Smith,A., & Hoffmann,W.H. (2010) Schistosoma co-infection protects against brain pathology but does not prevent severe disease and death in a murine model of cerebral malaria. *International Journal for Parasitology* **41**, 21-31.
- Dai,L., Zhu,L.J., Zheng,D.H., Mo,Y.Q., Wei,X.N., Su,J.H., Pessler,F. & Zhang,B.Y. (2010) Elevated serum glucose-6-phosphate isomerase correlates with histological disease activity and clinical improvement after initiation of therapy in patients with rheumatoid arthritis. *Journal of Rheumatology* **37**, 2452-2461.
- do Valle,T.Z., Billecocq,A., Guillemot,L., Alberts,R., Gomet,C., Geffers,R., Calabrese,K., Schughart,K., Bouloy,M., Montagutelli,X., & Panthier,J.J. (2010) A new mouse model reveals a critical role for host innate immunity in resistance to Rift Valley fever. *Journal of Immunology* **185**, 6146-6156.
- Durzynska,J., Blazejewska,P., Szydowski,J. & Gozdicka-Jozefiak,A. (2010) Detection of anti-HPV11-L1 antibodies in immune sera from patients suffering from recurrent respiratory papillomatosis using ELISA. *Viral Immunology* **23**, 415-423.
- Faller,G., Mikolajczyk,R.T., Akmatov,M.K.*, Meier,S. & Kramer,A. (2010) Accidents in the context of study among university students - a multicentre cross-sectional study in North Rhine-Westphalia, Germany. *Accidents Analysis Prevention* **42**, 487-491.
- Gruenberger,M., Alberts,R., Smedley,D., Swertz,M., Schofield,P. & Schughart,K. (2010) Towards the integration of mouse databases - definition and implementation of solutions to two use-cases in mouse functional genomics. *BMC Research Notes* **3**, 16.
- Hahn,P., Wegener,I., Burrells,A., Bose,J., Wolf,A., Erck,C., Butler,D., Schofield,C.J., Bottger,A. & Lengeling,A. (2010) Analysis of Jmjd6 cellular localization and testing for its involvement in histone demethylation. *PLoS ONE* **5**, e13769.
- Hauck,F., Lee-Kirsch,M.A., Aust,D., Roesler,J. & Pessler,F. (2010) Complement C2 deficiency disarranging innate and adaptive humoral immune responses in a pediatric patient: Treatment with rituximab. *Arthritis Care Res (Hoboken.)* **63**, 454-459.
- Holz,A., Kollmus,H., Ryge,J., Niederkofler,V., Dias,J., Ericson,J., Stoeckli,E.T., Kiehn,O. & Arnold,H.H. (2010) The transcription factors Nkx2.2 and Nkx2.9 play a novel role in floor plate development and commissural axon guidance. *Development* **137**, 4249-4260.
- Kim,J.K., Kayali,G., Walker,D., Forrest,H.L., Ellebedy,A.H., Griffin,Y.S., Rubrum,A., Bahgat,M.M.*, Kutkat,M.A., Ali,M.A., Aldridge,J.R., Negovetich,N.J., Krauss,S., Webby,R.J. & Webster,R.G. (2010) Puzzling inefficiency of H5N1 influenza vaccines in Egyptian poultry. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 11044-11049.
- Meier,S., Mikolajczyk,R.T., Helmer,S., Akmatov,M., Steinke,B. & Krämer,A. (2010) Health status of students - Results from a multi-centre cross-sectional study in North Rhine-Westphalia, Germany [Prävalenz von Erkrankungen und Beschwerden bei Studierenden in NRW - Ergebnisse des Gesundheits surveys NRW]. *Prävention und Gesundheitsförderung* **5**, 257-264.
- Michaelson,J.J., Alberts,R., Schughart,K. & Beyer,A. (2010) Data-driven assessment of eQTL mapping methods. *BMC GENOMICS* **11**, 502.
- Moller,J., Girschick,H.J., Hahn,G. & Pessler,F. (2010) [Steroid-induced spinal epidural lipomatosis in pediatric patients]. *Zeitschrift Rheumatologie* **69**, 447-449.
- Ogdie,A., Schumacher,H.R., Jr., Dai,L., Chen,L.X., Einhorn,E. & Pessler,F. (2010) Synovial biopsy findings in arthritis associated with hepatitis C virus infection. *Journal of Rheumatology* **37**, 1361-1363.
- Ogdie,A., Li,J., Dai,L., Paessler,M.E., Yu,X., az-Torne,C., Akmatov,M., Schumacher,H.R. & Pessler,F. (2010) Identification of broadly discriminatory tissue biomarkers of synovitis with binary and multi-category receiver operating characteristic analysis. *Biomarkers* **15**, 183-190.
- Schofield,P.N., Eppig,J., Huala,E., De Angelis,M.H., Harvey,M., Davidson,D., Weaver,T., Brown,S., Smedley,D., Rosenthal,N., Schughart,K., Aidinis,V., Tocchini-Valentini,G. & Hancock,J.M. (2010) Research funding. Sustaining the data and bioresource commons. *Science* **330**, 592-593.
- Schughart,K. (2010) SYSGENET: a meeting report from a new European network for systems genetics. *Mammalian Genome* **21**, 331-336.
- Slansky,E., Li,J., Haupl,T., Morawietz,L., Krenn,V. & Pessler,F. (2010) Quantitative determination of the diagnostic accuracy of the synovitis score and its components. *Histopathology* **57**, 436-443.
- Smedley,D., Schofield,P., Chen,C.K., Aidinis,V., Ainali,C., Bard,J., Balling,R., Birney,E., Blake,A., Bongcam-Rudloff,E., Brookes,A.J., Cesareni,G., Chandras,C., Eppig,J., Flicek,P., Gkoutos,G., Greenaway,S., Gruenberger,M., Heriche,J.K., Lyall,A., Mallon,A.M., Muddyman,D., Reisinger,F., Ringwald,M., Rosenthal,N., Schughart,K., Swertz,M., Thorisson,G.A., Zouberakis,M. & Hancock,J.M. (2010) Finding and sharing: new approaches to registries of databases and services for the biomedical sciences. *Database (Oxford)* **2010**, baq014.
- Swertz,M.A., Velde,K.J., Tesson,B.M., Scheltema,R.A., Arends,D., Vera,G., Alberts,R., Dijkstra,M., Schofield,P., Schughart,K., Hancock,J.M., Smedley,D., Wolstencroft,K., Goble,C., de Brock,E.O., Jones,A.R., Parkinson,H.E. & Jansen,R.C. (2010) XGAP: a uniform and extensible data model and software platform for genotype and phenotype experiments. *Genome Biology* **11**, R27.
- Wu,H., Haist,V., Baumgartner,W., & Schughart,K. (2010) Sustained viral load and late death in Rag2^{-/-} mice after influenza A virus infection. *Virology Journal* **7**, 172.
- Zouberakis,M., Chandras,C., Swertz,M., Smedley,D., Gruenberger,M., Bard,J., Schughart,K., Rosenthal,N., Hancock,J.M., Schofield,P.N., Kollias,G. & Aidinis,V. (2010) Mouse Resource Browser - a database of mouse databases. *Database (Oxford)* **2010**, baq010.
- Akmatov,M.K.*. (2011) Child abuse in 28 developing and transitional countries - results from the Multiple Indicator Cluster Surveys. *International Journal of Epidemiology* **40**, 219-227.
- Bahgat,M.M., Blazejewska,P. & Schughart,K. (2011) Inhibition of lung serine proteases in mice: a potentially new approach to control influenza infection. *Virology Journal* **8**, 27.
- Blazejewska,P., Koscinski,L., Viegas,N., Anhlan,D., Ludwig,S. & Schughart,K. (2011) Pathogenicity of different PR8 influenza A virus variants in mice is determined by both viral and host factors. *Virology* **412**, 36-45.
- Bruck,N., Suttrop,M., Kabus,M., Heubner,G., Gahr,M. & Pessler,F. (2011) Rapid and sustained remission of systemic juvenile idiopathic arthritis-associated macrophage activation syndrome through treatment with anakinra and corticosteroids. *Journal of Clinical Rheumatology* **17**, 23-27.

- Gemulla,G. & Pessler,F. (2011) Can norovirus infection lead to a postinfectious arthritis? Report of 2 possible cases. *Klinische Pädiatrie* **223**, 43-44.
- Schneider,J., Fricke,C., Overwin,H. & Hofer,B. (2011) High level expression of a recombinant amylosucrase gene and selected properties of the enzyme. *Applied Microbiology and Biotechnology*, in press.
- Akmatov,M., Mikolajczyk,R.T., Meier,S. & Krämer,A. (2011) Alcohol consumption among university students in North Rhine-Westphalia, Germany - results from a multicentre cross-sectional study. *Journal of American College Health*, in press.
- Alberts,R. & Schughart,K. (2011) High throughput gene expression analysis and the identification of expression QTLs. In *Gene Discovery for Disease Models* John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA, in press.
- Dai,L., Wei,X.N., Zheng,D.H., Mo,Y.Q., Pessler,F. & Zhang,B.Y. (2011) Effective treatment of Kimura's disease with leflunomide in combination with glucocorticoids. *Clinical Rheumatology*, in press.
- Hauck,F., Lee-Kirsch,M.A., Aust,D., Roesler,J. & Pessler,F. (2011) Disarranged innate and adaptive humoral immune responses in complement 2 deficiency: treatment with rituximab. *Arthritis Care and Research (Hoboken)*, in press.
- Pessler,F. & Sherry,D.D. (2011) Rheumatic Fever. In *The Merck Manual*, in press.
- von Jagwitz,M., Pessler,F. & Akmatov,M. (2011) Exhaled breath condensate pH as risk factor for asthma in asymptomatic children with prior wheezing. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, in press.

AG Systemorientierte Immunologie und Entzündungsforschung | Prof. Dr. Ingo Schmitz

- Brandt,S., Ellwanger,K., Beuter-Gunia,C., Schuster,M., Hausser,A., Schmitz,I., & Beer-Hammer,S. (2010) SLY2 targets the nuclear SAP30/HDAC1 complex. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **42**, 1472-1481.
- Emadi,B.M., Soheili,Z.S., Schmitz,I., Sameie,S., & Schulz,W.A. (2010) Snail regulates cell survival and inhibits cellular senescence in human metastatic prostate cancer cell lines. *Cell Biology and Toxicology* **26**, 553-567.
- Smith,A.J., Dai,H., Correia,C., Takahashi,R., Lee,S.H., Schmitz,I., & Kaufmann,S.H. (2011) Noxa/Bcl-2 interactions contribute to bortezomib resistance in human lymphoid cells. *Journal of Biological Chemistry*, in press.

Abt. für Experimentelle Immunologie | Prof. Dr. Jochen Hühn

- Hubert,S., Rissiek,B., Klages,K., Hühn,J., Sparwasser,T., Haag,F., Koch-Nolte,F., Boyer,O., Seman,M., & Adriouch,S. (2010) Extracellular NAD⁺ shapes the Foxp3⁺ regulatory T cell compartment through the ART2-P2X7 pathway. *Journal of Experimental Medicine* **207**, 2561-2568.
- Humrich,J.Y., Morbach,H., Undeutsch,R., Enghard,P., Rosenberger,S., Weigert,O., Kloke,L., Heimann,J., Gaber,T., Brandenburg,S., Scheffold,A., Hühn,J., Radbruch,A., Burmester,G.R., & Riemekasten,G. (2010) Homeostatic imbalance of regulatory and effector T cells due to IL-2 deprivation amplifies murine lupus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 204-209.
- Klages,K., Mayer,C.T., Lahl,K., Loddenkemper,C., Teng,M.W., Ngiow,S.F., Smyth,M.J., Hamann,A., Hühn,J., & Sparwasser,T. (2010) Selective depletion of Foxp3⁺ regulatory T cells improves effective therapeutic vaccination against established melanoma. *Cancer Research* **70**, 7788-7799.

- Mayer,C.T., Floess,S., Baru,A.M., Lahl,K., Hühn,J., & Sparwasser,T. (2011) CD8(+) Foxp3(+) T cells share developmental and phenotypic features with classical CD4(+) Foxp3(+) regulatory T cells but lack potent suppressive activity. *European Journal of Immunology* **41**, 716-725.
- Menning,A., Loddenkemper,C., Westendorf,A.M., Szilagy,B., Buer,J., Siewert,C., Hamann,A., & Hühn,J. (2010) Retinoic acid-induced gut tropism improves the protective capacity of Treg in acute but not in chronic gut inflammation. *European Journal of Immunology* **40**, 2539-2548.
- Polansky,J.K., Schreiber,L., Thelemann,C., Ludwig,L., Kruger,M., Baumgrass,R., Cording,S., Floess,S., Hamann,A., & Hühn,J. (2010) Methylation matters: binding of Ets-1 to the demethylated Foxp3 gene contributes to the stabilization of Foxp3 expression in regulatory T cells. *Journal of Molecular Medicine* **88**, 1029-1040.
- Toker,A. & Hühn,J. (2011) To be or not to be a Treg cell: lineage decisions controlled by epigenetic mechanisms. *Science Signaling* **4**, e4.

AG Immunregulation | Priv.-Doz. Dr. Dunja Bruder

- Bar-On,L., Birnberg,T., Lewis,K.L., Edelson,B.T., Bruder,D., Hildner,K., Buer,J., Murphy,K.M., Reizis,B., & Jung,S. (2010) CX3CR1⁺ CD8α⁺ dendritic cells are a steady-state population related to plasmacytoid dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 14745-14750.
- Bruns,S., Kniemeyer,O., Hasenberg,M., Aimaniananda,V., Nietzsche,S., Thywissen,A., Jeron,A., Latge,J.P., Brakhage,A.A., & Gunzer,M. (2010) Production of extracellular traps against *Aspergillus fumigatus* in vitro and in infected lung tissue is dependent on invading neutrophils and influenced by hydrophobin RodA. *PLoS Pathogens* **6**, e1000873.
- Liesz,A., Zhou,W., Mracskó,E., Karcher,S., Doerr,H., Schwarting,S., Sun,L., Bruder,D., Stegemann,S., Cerwenka,A., Sommer,C., Dalpke,A., & Veltkamp,R. (2011) Inhibition of lymphocyte trafficking shields the brain against deleterious neuroinflammation after stroke. *Brain* **134**, 704-720.
- Hasenberg,M., Köhler,A., Jeron,A., Bonifatius,S., & Gunzer,M. (2011) Direct observation of phagocytosis and NET formation by neutrophils in infected lungs using 2-photon microscopy. *Journal of Visualized Experiments*, in press.
- Tosiek,M.J., Gruber,A.D., Bader,S., Hoymann,H.G., Mael,S., Tschwernig,T., Buer,J., Gereke,M., & Bruder,D. (2011) CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells are dispensable for controlling CD8⁺ T cell-mediated lung inflammation. *Journal of Immunology*, in press.

Abt. für System-Immunologie | Prof. Dr. Michael Meyer-Hermann

- Garin,A., Meyer-Hermann,M., Contie,M., Figge,M.T., Buatois,V., Gunzer,M., Toellner,K.M., Elson,G., & Kosco-Vilbois,M.H. (2010) Toll-like receptor 4 signaling by follicular dendritic cells is pivotal for germinal center onset and affinity maturation. *Immunity* **33**, 84-95.
- Jain,H.V. & Meyer-Hermann,M. (2010) The molecular basis of synergism between carboplatin and ABT-737 therapy targeting ovarian carcinomas. *Cancer Research* **71**, 705-715.
- Kempf,H., Bleicher,M., & Meyer-Hermann,M. (2010) Spatio-temporal cell dynamics in tumour spheroid irradiation. *European Physical Journal D* **60**, 177-193.
- Kobayashi,Y. & Telschow,A. (2010) Cytoplasmic feminizing elements in a two-population model: infection dynamics, gene flow modification, and the spread of autosomal suppressors. *Journal of Evolutionary Biology* **23**, 2558-2568.
- Meyer-Hermann,M. & Benninger,R.K. (2010) A mathematical model of beta-cells in an islet of Langerhans sensing a glucose gradient. *HFSP Journal* **4**, 61-71.

- Victora,G.D., Schwickert,T.A., Fooksman,D.R., Kamphorst,A.O., Meyer-Hermann,M., Dustin,M.L., & Nussenzweig,M.C. (2010) Germinal center dynamics revealed by multiphoton microscopy with a photoactivatable fluorescent reporter. *Cell* **143**, 592-605.
 - Grise,G. & Meyer-Hermann,M. (2011) Surface reconstruction using Delaunay triangulation for applications in life sciences. *Computer Physics Communications* **182**, 967-977.
 - Kobayashi,Y. & Telschow,A. (2011) The concept of effective recombination rate and its application in speciation theory. *Evolution* **65**, 617-628.
- Abt. für Chemische Biologie | Dr. Ronald Frank, Dr. Florenz Sasse**
- Andreetto,E., Yan,L.M., Tatarek-Nossol,M., Velkova,A., Frank,R., & Kapurniotu,A. (2010) Identification of hot regions of the abeta-IAPP interaction interface as high-affinity binding sites in both cross- and self-association. *Angewandte Chemie International Edition* **49**, 3081-
 - Barnickel,B., Bayliffe,F., Diestel,R., Kempf,K., Laschat,S., Pachali,S., Sasse,F., Schlenk,A., & Schobert,R. (2010) Structure-activity relationships of precursors and analogs of natural 3-enoyl-tetramic acids. *Chemistry & Biodiversity* **7**, 2830-2845.
 - Beutling,U. & Frank,R. (2010) Epitope analysis using synthetic peptide repertoires prepared by SPOT synthesis technology. In: *Antibody Engineering* (Kontermann,R. & Dübel,S., eds.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
 - Bourbeillon,J., Orchard,S., Benhar,I., Borrebaeck,C., de,D.A., Dubel,S., Frank,R., Gibson,F., Gloriam,D., Haslam,N., Hiltker,T., Humphrey-Smith,I., Hust,M., Juncker,D., Koegl,M., Konthur,Z., Korn,B., Krobitch,S., Muyldermans,S., Nygren,P.A., Palcy,S., Polic,B., Rodriguez,H., Sawyer,A., Schlapshy,M., Snyder,M., Stoevesandt,O., Taussig,M.J., Templin,M., Uhlen,M., van der,M.S., Wingren,C., Hermjakob,H., & Sherman,D. (2010) Minimum information about a protein affinity reagent (MIAPAR). *Nature Biotechnology* **28**, 650-653.
 - Brodmann,T., Janssen,D., Sasse,F., Irschik,H., Jansen,R., Müller,R., & Kalesse,M. (2010) Isolation and synthesis of chivotriene, a chivosazole shunt product from *Sorangium cellulosum*. *European Journal of Organic Chemistry* **27**, 5155-5159.
 - Buchner,A., Pohla,H., Willimsky,G., Frankenberger,B., Frank,R., Baur-Melnyk,A., Siebels,M., Stief,C.G., Hofstetter,A., Kopp,J., Pezzutto,A., Blankenstein,T., Oberneder,R., & Schendel,D.J. (2010) Phase 1 trial of allogeneic gene-modified tumor cell vaccine RCC-26/CD80/IL-2 in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Human Gene Therapy* **21**, 285-297.
 - Bulow,L., Nickleit,I., Girbig,A.K., Brodmann,T., Rentsch,A., Eggert,U., Sasse,F., Steinmetz,H., Frank,R., Carlomagno,T., Malek,N.P., & Kalesse,M. (2010) Synthesis and biological characterization of argyryrin F. *ChemMedChem* **5**, 832-836.
 - Frank,R., Theis,F.J., & Klamt,S. (2010) From binary to multivalued to continuous models: the lac operon as a case study. *Journal of Integrative Bioinformatics* **7**, 151-169.
 - Gloriam,D.E., Orchard,S., Bertinetti,D., Bjorling,E., Bongcam-Rudloff,E., Borrebaeck,C.A., Bourbeillon,J., Bradbury,A.R., de,D.A., Dubel,S., Frank,R., Gibson,T.J., Gold,L., Haslam,N., Herberg,F.W., Hiltke,T., Hoheisel,J.D., Kerrien,S., Koegl,M., Konthur,Z., Korn,B., Landegren,U., Montecchi-Palazzi,L., Palcy,S., Rodriguez,H., Schweinsberg,S., Sievert,V., Stoevesandt,O., Taussig,M.J., Ueffing,M., Uhlen,M., van der,M.S., Wingren,C., Woollard,P., Sherman,D.J., & Hermjakob,H. (2010) A community standard format for the representation of protein affinity reagents. *Molecular and Cellular Proteomics* **9**, 1-10.
 - Harmrolfs,K., Brunjes,M., Drager,G., Floss,H.G., Sasse,F., Taft,F., & Kirschning,A. (2010) Cyclization of synthetic seco-proansamitocins to ansamitocin macrolactams by *Actinosynnema pretiosum* as biocatalyst. *ChemBioChem* **11**, 2517-2520.
 - Heinzelmann,K., Scholz,B.A., Nowak,A., Fossum,E., Kremmer,E., Haas,J., Frank,R., & Kempkes,B. (2010) Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus viral interferon regulatory factor 4 (vIRF4/K10) is a novel interaction partner of CSL/CBF1, the major downstream effector of Notch signaling. *Journal of Virology* **84**, 12255-12264.
 - Kubicek,K., Grimm,S.K., Orts,J., Sasse,F., & Carlomagno,T. (2010) The tubulin-bound structure of the antimetabolic drug tubulysin. *Angewandte Chemie International Edition* **49**, 4809-4812.
 - Meens,J., Bolotin,V., Frank,R., Bohmer,J., & Gerlach,G.F. (2010) Characterization of a highly immunogenic *Mycoplasma hyopneumoniae* lipoprotein Mhp366 identified by peptide-spot array. *Veterinary Microbiology* **142**, 293-302.
 - Meyer,T., Stratmann-Selke,J., Meens,J., Schirrmann,T., Gerlach,G.F., Frank,R., Dubel,S., Strutzberg-Minder,K., & Hust,M. (2010) Isolation of scFv fragments specific to OmpD of *Salmonella typhimurium*. *Veterinary Microbiology* **147**, 162-169.
 - Micklinghoff,J.C., Schmidt,M., Geffers,R., Tegge,W., & Bange,F.C. (2010) Analysis of expression and regulatory functions of the ribosome-binding protein TypA in *Mycobacterium tuberculosis* under stress conditions. *Archives of Microbiology* **192**, 499-504.
 - Nickl,C.K., Raidas,S.K., Zhao,H., Sausbier,M., Ruth,P., Tegge,W., Brayden,J.E., & Dostmann,W.R. (2010) (d)-Amino acid analogues of DT-2 as highly selective and superior inhibitors of cGMP-dependent protein kinase Ialpha. *Biochimica et Biophysica Acta* **1804**, 524-532.
 - Nicolas,L., Anderl,T., Sasse,F., Steinmetz,H., Jansen,R., Hofle,G., Laschat,S., & Taylor,R.E. (2010) Gephyronic acid, a missing link between polyketide inhibitors of eukaryotic protein synthesis (Part I): Structural revision and stereochemical assignment of gephyronic acid. *Angewandte Chemie International Edition* **50**, 938-941.
 - Rink,C., Sasse,F., Zubriene,A., Matulis,D., & Maier,M.E. (2010) Probing the influence of an allylic methyl group in zearalenone analogues on binding to Hsp90. *Chemistry* **16**, 14469-14478.
 - Schackel,R., Hinkelmann,B., Sasse,F., & Kalesse,M. (2010) The synthesis of novel disorazoles. *Angewandte Chemie International Edition* **49**, 1619-1622.
 - Schlenk,A., Diestel,R., Sasse,F., & Schobert,R. (2010) A selective 3-acylation of tetramic acids and the first synthesis of ravenic acid. *Chemistry* **16**, 2599-2604.
 - Schobert,R., Sasse,F., Biersack,B., Effenberger,K., Breyer,S., & Diestel,R. (2010) Tumor-selective amphiphilic para-quinones and tetramic acids. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* **48**, 459-461.
 - Schulz,S., Dickschat,J.S., Kunze,B., Wagner-Döbler,I., Diestel,R., & Sasse,F. (2010) Biological activity of volatiles from marine and terrestrial bacteria. *Marine Drugs* **8**, 2976-2987.
 - Sharma,R.K., Sundriyal,S., Wangoo,N., Tegge,W., & Jain,R. (2010) New antimicrobial hexapeptides: synthesis, antimicrobial activities, cytotoxicity, and mechanistic studies. *ChemMedChem* **5**, 86-95.
 - Voigt,J., Kiess,M., Getzlaff,R., Wostemeyer,J., & Frank,R. (2010) Generation of the heterodimeric precursor GP3 of the *Chlamydomonas* cell wall. *Molecular Microbiology* **77**, 1512-1526.
 - Capell,A., Liebscher,S., Fellerer,K., Brouwers,N., Willem,M., Lammich,S., Gijssels,I., Bittner,T., Carlson,A.M., Sasse,F., Kunze,B., Steinmetz,H., Jansen,R., Dormann,D., Slegers,K., Cruts,M., Herms,J., Van,B.C., & Haass,C. (2011) Rescue of progranulin deficiency associated with frontotemporal lobar degeneration by alkalizing reagents and inhibition of vacuolar ATPase. *Journal of Neuroscience* **31**, 1885-1894.
 - Elsebai,M.F., Kehraus,S., Lindequist,U., Sasse,F., Shaaban,S., Gutschow,M., Josten,M., Sahl,H.G., & König,G.M. (2011) Antimicrobial phenalenone derivatives from the marine-derived fungus *Coniothyrium cereale*. *Organic and Biomolecular Chemistry* **9**, 802-808.

- Knobloch, T., Harmrolfs, K., Taft, F., Thomaszewski, B., Sasse, F., & Kirschning, A. (2011) Mutational biosynthesis of ansamitocin antibiotics: A diversity-oriented approach to exploit biosynthetic flexibility. *ChemBioChem* **13**, 540-547.
- Omnus, D.J., Mehrtens, S., Ritter, B., Resch, K., Yamada, M., Frank, R., Nourbakhsh, M., & Rebol, M.R. (2011) JKTBP1 is involved in stabilization and IRES-dependent translation of NRF mRNAs by binding to 5' and 3' untranslated regions. *Journal of Molecular Biology* **407**, 492-504.
- Wunderlich, K., Juozapaitis, M., Ranadheera, C., Kessler, U., Martin, A., Eisel, J., Beutling, U., Frank, R., & Schwemmler, M. (2011) Identification of high-affinity PB1-derived peptides with enhanced affinity to the PA protein of Influenza A virus polymerase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **55**, 696-702.
- Anderl, T., Nicolas, L., Munkemer, J., Baro, A., Sasse, F., Steinmetz, H., Jansen, R., Hofle, G., Taylor, R.E., & Laschat, S. (2011) Gephyronic acid, a missing link between polyketide inhibitors of eukaryotic protein synthesis (Part II): Total synthesis of gephyronic acid. *Angewandte Chemie International Edition*, in press.
- Bremer, C.M., Sominskaya, I., Skrastina, D., Pumpens, P., Wahed, A.A., Beutling, U., Frank, R., Fritz, H.J., Hunsmann, G., Gerlich, W.H., & Glebe, D. (2011) N-terminal myristoylation-dependent masking of neutralizing epitopes in the preS1 attachment site of hepatitis B virus. *Journal of Hepatology*, in press.
- Kraemer, S., Lue, H., Zerneck, A., Kapurniotou, A., Andreetto, E., Frank, R., Lennartz, B., Weber, C., & Bernhagen, J. (2011) MIF-chemokine receptor interactions in atherosclerosis are dependent on an N-loop-based 2-site binding mechanism. *FASEB Journal*, in press.
- Maenz, B., Goetz, V., Wunderlich, K., Eisel, J., Kirchmair, J., Stech, J., Stech, O., Chase, G., Frank, R., & Schwemmler, M. (2011) Disruption of the viral polymerase complex assembly as a novel approach to attenuate influenza A virus. *Journal of Biological Chemistry*, in press.
- Ritter, B., Kilian, P., Rebol, M.R., Resch, K., Distefano, J.K., Frank, R., Beil, W., & Nourbakhsh, M. (2011) Differential effects of multiplicity of infection on *Helicobacter pylori*-induced signaling pathways and interleukin-8 gene transcription. *Journal of Clinical Immunology*, in press.
- Schneider, J., Fricke, C., Overwin, H., & Hofer, B. (2011) High level expression of a recombinant amylosucrase gene and selected properties of the enzyme. *Applied Microbiology and Biotechnology*, in press.
- Westermann, J., Florcken, A., Willmsky, G., van, L.A., Kopp, J., Takvorian, A., Johrens, K., Lukowsky, A., Schonemann, C., Sawitzki, B., Pohla, H., Frank, R., Dorken, B., Schendel, D.J., Blankenstein, T., & Pezzutto, A. (2011) Allogeneic gene-modified tumor cells (RCC-26/IL-7/CD80) as a vaccine in patients with metastatic renal cell cancer: a clinical phase-I study. *Gene Therapy*, in press.
- Bulow, L., Nিকেleit, I., Girbig, A.K., Brodmann, T., Rentsch, A., Eggert, U., Sasse, F., Steinmetz, H., Frank, R., Carlomagno, T., Malek, N.P., & Kalesse, M. (2010) Synthesis and biological characterization of argyrin F. *ChemMedChem* **5**, 832-836.
- Kena, D.A., Noll, C., Richter, M., Gieseler, M.T., & Kalesse, M. (2010) Intramolecular stereoselective protonation of aldehyde-derived enolates. *Angewandte Chemie International Edition* **49**, 8367-8369.
- Li, P., Li, J., Arikian, F.*, Ahlbrecht, W., Dieckmann, M., & Menche, D. (2010) Stereoselective total synthesis of etnangien and etnangien methyl ester. *Journal of Organic Chemistry* **75**, 2429-2444.
- Menche, D., Li, P., & Irschik, H. (2010) Design, synthesis and biological evaluation of simplified analogues of the RNA polymerase inhibitor etnangien. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **20**, 939-941.
- Mohamed, I.E., Kehraus, S., Krick, A., König, G.M., Kelter, G., Maier, A., Fiebig, H.H., Kalesse, M., Malek, N.P., & Gross, H. (2010) Mode of action of epoxyphomalins A and B and characterization of related metabolites from the marine-derived fungus *Paraconiothyrium* sp. *Journal of Natural Products* **73**, 2053-2056.
- Rand, K., Noll, C., Schiebel, H.M., Kemken, D., Dulcks, T., Kalesse, M., Heinz, D.W.*, & Layer, G. (2010) The oxygen-independent coproporphyrinogen III oxidase HemN utilizes harderoporphyryrinogen as a reaction intermediate during conversion of coproporphyrinogen III to protoporphyrinogen IX. *Biological Chemistry* **391**, 55-63.
- Schackel, R., Hinkelmann, B., Sasse, F., & Kalesse, M. (2010) The synthesis of novel disorazoles. *Angewandte Chemie International Edition* **49**, 1619-1622.
- Stauch, B., Simon, B., Basile, T., Schneider, G., Malek, N.P., Kalesse, M., & Carlomagno, T. (2010) Elucidation of the structure and intermolecular interactions of a reversible cyclic-peptide inhibitor of the proteasome by NMR spectroscopy and molecular modeling. *Angewandte Chemie International Edition* **49**, 3934-3938.

AG Umweltmikrobiologie | Prof. Dr. Ken N. Timmis

- Beloqui, A., Nechitaylo, T.Y., Lopez-Cortes, N., Ghazi, A., Guazzaroni, M.E., Polaina, J., Strittmatter, A.W., Reva, O., Waliczek, A., Yakimov, M.M., Golyshina, O.V., Ferrer, M., & Golyshin, P.N. (2010) Diversity of glycosyl hydrolases from cellulose-depleting communities enriched from casts of two earthworm species. *Applied and Environmental Microbiology* **76**, 5934-5946.
- Beloqui, A., Polaina, J., Vieites, J.M., Reyes-Duarte, D., Torres, R., Golyshina, O.V., Chernikova, T.N., Waliczek, A., Aharoni, A., Yakimov, M.M., Timmis, K.N.*, Golyshin, P.N., & Ferrer, M. (2010) Novel hybrid esterase-haloacid dehalogenase enzyme. *ChemBioChem* **11**, 1975-1978.
- Fazzini, R.A., Preto, M.J., Quintas, A.C., Bielecka, A., Timmis, K.N.*, & dos Santos, V.A.P.M.*. (2010) Consortia modulation of the stress response: proteomic analysis of single strain versus mixed culture. *Environmental Microbiology* **12**, 2436-2449.
- Gertler, C., Näther, D.J., Gerdt, G., Malpass, M.C., & Golyshin, P.N.*. (2010) A mesocosm study of the changes in marine flagellate and ciliate communities in a crude oil bioremediation trial. *Microbial Ecology* **60**, 180-191.
- Martin-Arjol, I., Bassas-Galia, M.*, Bermudo, E., Garcia, F., & Manresa, A. (2010) Identification of oxylipins with antifungal activity by LC-MS/MS from the supernatant of *Pseudomonas* 42A2. *Chemistry and Physics of Lipids* **163**, 341-346.
- Nechitaylo, T.Y., Yakimov, M.M., Godinho, M., Timmis, K.N.*, Belogolova, E., Byzov, B.A., Kurakov, A.V., Jones, D.L., & Golyshin, P.N. (2010) Effect of the earthworms *Lumbricus terrestris* and *Aporrectodea caliginosa* on bacterial diversity in soil. *Microbial Ecology* **59**, 574-587.

AG Biologische Systemanalyse | Prof. Dr. Ursula Bilitewski

- Klippel, N., Cui, S., Groebe, L., & Bilitewski, U. (2010) Deletion of the *Candida albicans* histidine kinase gene CHK1 improves recognition by phagocytes through an increased exposure of cell wall beta-1,3-glucans. *Microbiology* **156**, 3432-3444.

Abt. für Medizinische Chemie | Prof. Dr. Markus Kalesse

- Brodmann, T., Janssen, D., Sasse, F., Irschik, H., Jansen, R., Müller, R., & Kalesse, M. (2010) Isolation and synthesis of chivotriene, a chivosazole shunt product from *Sorangium cellulosum*. *European Journal of Organic Chemistry* **27**, 5155-5159.
- Brodmann, T., Janssen, D., & Kalesse, M. (2010) Total synthesis of chivosazole F. *Journal of the American Chemical Society* **132**, 13610-13611.

- Nechitaylo,T.Y., Timmis,K.N.*., Byzov,B.A., Kurakov,A.V., Jones,D.L., Ferrer,M., Belogolova,E., & Golyshin,P.N. (2010) Fate of prions in soil: Degradation of recombinant prion in aqueous extracts from soil and casts of two earthworm species. *Soil Biology and Biochemistry* **42**, 1168-1171.
- Oxley,A.P., Lanfrancioni,M.P., Wurdemann,D., Ott,S., Schreiber,S., McGenity,T.J., Timmis,K.N.*., & Nogales,B. (2010) *Halophilic archaea* in the human intestinal mucosa. *Environmental Microbiology* **12**, 2398-2410.
- Timmis,K.N.*. (2010) Human biome biotechnology and the personalization of odour profiles. *Microbial Biotechnology* **2**, 150-152.
- Wiethaus,J., Busch,A.W., Dammeyer,T., & Frankenberg-Dinkel,N. (2010) Phycobiliproteins in *Prochlorococcus marinus*: biosynthesis of pigments and their assembly into proteins. *European Journal of Cell Biology* **89**, 1005-1010.
- Ferrer,M., Beloqui,A., Zumárraga,M., Alcalde,M., & Golyshin,P.N.* (2011) Microbes and enzymes: recent trends and new directions to explore protein diversity space. In: Protein Engineering Handbook (Bornscheuer,U., ed.), Wiley, in press
- Gertler,C., Gerds,G., Yakimov,M.M., Timmis,K.N.*., & Golyshin,P.N.*. (2011) Populations of heavy fuel oil-degrading marine microbial community on oil-degrading marine microbial community on oil sorbent material surface. *Journal of Applied Microbiology*, in press.
- Guzmán,C.A.*. & Timmis,K.N.* (2011) Towards intelligent vaccines: the VAC-CHIP. In the "Crystal ball - 2011" section. *Microbial Biotechnology*, in press
- Sabirova,J.S., Haddouche,R., Van Bogaert,I.N., Mulaa,F., Verstraete,W., Timmis,K.N.*., Schmid-Dannert,C., Nicaud,J.M., & Soetaert,W. (2011) The Lipo Yeast project: using the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* in combination with specific bacterial genes for the bioconversion of lipids, fats and oils into high-value products. *Microbial Biotechnology*, in press.

Abt. für Genomanalyse | Dr. Helmut Blöcker

- Buntin,K., Irschik,H., Weissman,K.J., Luxenburger,E., Blöcker,H., & Müller,R. (2010) Biosynthesis of thuggacins in myxobacteria: comparative cluster analysis reveals basis for natural product structural diversity. *Chemistry and Biology* **17**, 342-356.
- Danilowicz,E., Martinez-Arias,R., Dolf,G., Singh,M., Probst,I., Tummler,B., Holtig,D., Waldmann,K.H., Gerlach,G.F., Stanke,F., & Leeb,T. (2010) Characterization of the porcine transferrin gene (TF) and its association with disease severity following an experimental *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection. *Animal Genetics* **41**, 424-427.
- Deyneko,I.V., Kalybaeva,Y.M., Kel,A.E., & Blöcker,H. (2010) Human-chimpanzee promoter comparisons: Property-conserved evolution? *Genomics* **96**, 129-133.
- Dötsch,A., Klawonn,F., Jarek,M., Scharfe,M., Blöcker,H., & Häußler,S. (2010) Evolutionary conservation of essential and highly expressed genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC GENOMICS* **11**, 234.
- Hu,Y., van der,G.R., Besra,G.S., Gurucha,S.S., Liu,A., Rohde,M., Singh,M., & Coates,A. (2010) 3-Ketosteroid 9alpha-hydroxylase is an essential factor in the pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Microbiology* **75**, 107-121.
- Lin,L., Flisikowski,K., Schwarzenbacher,H., Scharfe,M., Severitt,S., Blöcker,H., & Fries,R. (2010) Characterization of the porcine *AMPK alpha 2 catalytic subunit gene (PRKAA2)*: genome structure, polymorphism detection and association study. *Animal Genetics* **41(2)**, 203-207
- Scholler,J., Singh,M., Bergmeier,L., Brunstedt,K., Wang,Y., Whittall,T., Rahman,D., Pido-Lopez,J., & Lehner,T. (2010) A recombinant human HLA-class I antigen linked to dextran elicits innate and adaptive immune responses. *Journal of Immunological Methods* **360**, 1-9.
- Varbiro,S., Biro,A., Cervenak,J., Cervenak,L., Singh,M., Banhidy,F., Sebestyen,A., Fust,G., & Prohaszka,Z. (2010) Human anti-60 kD heat shock protein autoantibodies are characterized by basic features of natural autoantibodies. *Acta Physiologica Hungarica* **97**, 1-10.
- von Groll,A., Martin,A., Stehr,M., Singh,M., Portaels,F., da Silva,P.E., & Palomino,J.C. (2010) Fitness of *Mycobacterium tuberculosis* strains of the W-Beijing and Non-W-Beijing genotype. *PLoS ONE* **5**, e10191.
- Adhikary,T., Kaddatz,K., Finkernagel,F., Schonbauer,A., Meissner,W., Scharfe,M., Jarek,M., Blöcker,H., Muller-Brusselbach,S., & Müller,R. (2011) Genomewide analyses define different modes of transcriptional regulation by peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta (PPARbeta/delta). *PLoS ONE* **6**, e16344.

Frühere Abt. für Zellbiologie | Prof. Dr. Jürgen Wehland

- Alberts,R., Srivastava,B., Wu,H., Viegas,N., Geffers,R., Klawonn,F., Novoselova,N., Zaverucha,d., V, Panthier,J.J., & Schughart,K. (2010) Gene expression changes in the host response between resistant and susceptible inbred mouse strains after influenza A infection. *Microbes and Infection* **12**, 309-318.
- Bruns,S., Kniemeyer,O., Hasenberg,M., Aimaniana,V., Nietzsche,S., Thywissen,A., Jeron,A., Latge,J.P., Brakhage,A.A., & Gunzer,M. (2010) Production of extracellular traps against *Aspergillus fumigatus* in vitro and in infected lung tissue is dependent on invading neutrophils and influenced by hydrophobin RodA. *PLoS Pathogens* **6**, e1000873.
- Christgen,M., Geffers,R., Ballmaier,M., Christgen,H., Poczka,J., Krech,T., Kreipe,H., & Lehmann,U. (2010) Down-regulation of the fetal stem cell factor SOX17 by H33342: a mechanism responsible for differential gene expression in breast cancer side population cells. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 6412-6418.
- Dietrich,N., Rohde,M., Geffers,R., Kroger,A., Hauser,H., Weiss,S., & Gekara,N.O. (2010) Mast cells elicit proinflammatory but not type I interferon responses upon activation of TLRs by bacteria. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 8748-8753.
- do Valle,T.Z., Billecocq,A., Guillemot,L., Alberts,R., Gomet,C., Geffers,R., Calabrese,K., Schughart,K., Bouloy,M., Montagutelli,X., & Panthier,J.J. (2010) A new mouse model reveals a critical role for host innate immunity in resistance to Rift Valley fever. *Journal of Immunology* **185**, 6146-6156.
- Fleissner,D., Hansen,W., Geffers,R., Buer,J., & Westendorf,A.M. (2010) Local induction of immunosuppressive CD8+ T cells in the gut-associated lymphoid tissues. *PLoS ONE* **5**, e15373.
- Garin,A., Meyer-Hermann,M., Contie,M., Figge,M.T., Buatois,V., Gunzer,M., Toellner,K.M., Elson,G., & Kosco-Vilbois,M.H. (2010) Toll-like receptor 4 signaling by follicular dendritic cells is pivotal for germinal center onset and affinity maturation. *Immunity* **33**, 84-95.
- Garritsen,H.S., Macke,L., Meyring,W., Hannig,H., Pagelow,U., Wormann,B., Geffers,R., Dittmar,K.E.*., & Lindenmaier,W. (2010) Efficient generation of clinical-grade genetically modified dendritic cells for presentation of multiple tumor-associated proteins. *Transfusion* **50**, 831-842.
- Gekara,N.O., Zietara,N., Geffers,R., & Weiss,S. (2010) *Listeria monocytogenes* induces T cell receptor unresponsiveness through pore-forming toxin listeriolysin O. *Journal of Infectious Diseases* **202**, 1698-1707.
- Hansen,W., Westendorf,A.M., Toepfer,T., Mauel,S., Geffers,R., Gruber,A.D., & Buer,J. (2010) Inflammation in vivo is modulated by GPR83 isoform-4 but not GPR83 isoform-1 expression in regulatory T cells. *Genes and Immunity* **11**, 357-361.
- Kahlisch,L., Henne,K., Gröbe,L., Draheim,J., Höfle,M.G.*., & Brettar,I. (2010) Molecular analysis of the bacterial drinking water community with respect to live/dead status. *Water Science and Technology* **61**, 9-14.

- Lefever, T., Pedersen, E., Basse, A., Paus, R., Quondamatteo, F., Stanley, A.C., Langbein, L., Wu, X., Wehland, J., Lommel, S., & Brakebusch, C. (2010) N-WASP is a novel regulator of hair-follicle cycling that controls antiproliferative TGF β pathways. *Journal of Cell Science* **123**, 128-140.
 - Leonhardt, J., Kuebler, J.F., Turowski, C., Tschernig, T., Geffers, R., & Petersen, C. (2010) Susceptibility to experimental biliary atresia linked to different hepatic gene expression profiles in two mouse strains. *Hepatology Research* **40**, 196-203.
 - Macke, L., Garritsen, H.S., Meyring, W., Hannig, H., Pagelow, U., Wormann, B., Piechaczek, C., Geffers, R., Rohde, M., Lindenmaier, W., & Dittmar, K.E.*. (2010) Evaluating maturation and genetic modification of human dendritic cells in a new polyolefin cell culture bag system. *Transfusion* **50**, 843-855.
 - Micklinghoff, J.C., Schmidt, M., Geffers, R., Tegge, W., & Bange, F.C. (2010) Analysis of expression and regulatory functions of the ribosome-binding protein TypA in *Mycobacterium tuberculosis* under stress conditions. *Archives of Microbiology* **192**, 499-504.
 - Pils, M.C., Pisano, F., Fasnacht, N., Heinrich, J.M., Gröbe, L., Schippers, A., Rozell, B., Jack, R.S., & Müller, W. (2010) Monocytes/macrophages and/or neutrophils are the target of IL-10 in the LPS endotoxemia model. *European Journal of Immunology* **40**, 443-448.
 - Quiel, A., Jürgen, B., Piechotta, G., Le Foll, A.P., Ziebandt, A.K., Kohler, C., Koster, D., Engelmann, S., Erck, C., Hintsche, R., Wehland, J., Hecker, M., & Schweder, T. (2010) Electrical protein array chips for the detection of staphylococcal virulence factors. *Applied Microbiology and Biotechnology* **85**, 1619-1627.
 - Stegmann, K.A., Björkström, N.K., Liermann, H., Ciesek, S., Riese, P., Wiegand, J., Hadem, J., Suneetha, P.V., Jaroszewicz, J., Wang, C., Schlaphoff, V., Fytilli, P., Cornberg, M., Manns, M.P., Geffers, R., Pietschmann, T., Guzmán, C.A.*., Ljunggren, H.-G., & Wedemeyer, H. (2010) IFN alpha-induced TRAIL on human NK cells is associated with control of hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* **138**, 1885-1897.
 - Steinweg, C., Kuenne, C.T., Billion, A., Mraheil, M.A., Domann, E., Ghai, R., Barbuddhe, S.B., Karst, U., Goesmann, A., Puhler, A., Weisshaar, B., Wehland, J., Lampidis, R., Kreft, J., Goebel, W., Chakraborty, T., & Hain, T. (2010) Complete genome sequence of *Listeria seeligeri*, a nonpathogenic member of the genus *Listeria*. *Journal of Bacteriology* **192**, 1473-1474.
 - Trunk, K., Benkert, B., Quack, N., Munch, R., Scheer, M., Garbe, J., Jänsch, L., Trost, M., Wehland, J., Buer, J., Jahn, M., Schobert, M., & Jahn, D. (2010) Anaerobic adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: definition of the Anr and Dnr regulons. *Environmental Microbiology* **12**, 1719-1733.
 - Wilke, S., Krausze, J., Gossen, M., Gröbe, L., Jäger, V., Gherardi, E., van den, H.J., & Bussow, K. (2010) Glycoprotein production for structure analysis with stable, glycosylation mutant CHO cell lines established by fluorescence-activated cell sorting. *Protein Science* **19**, 1264-1271.
 - Froese, N., Kattih, B., Breitbart, A., Grund, A., Geffers, R., Molkentin, J.D., Kispert, A., Wollert, K.C., Drexler, H., & Heineke, J. (2011) GATA6 promotes angiogenic function and survival in endothelial cells by suppression of autocrine transforming growth factor beta/activin receptor-like kinase 5 signaling. *Journal of Biological Chemistry* **286**(7), 5680-5690.
 - Lorenz, U., Lorenz, B., Schmitter, T., Streker, K., Erck, C., Wehland, J., Nickel, J., Zimmermann, B., & Ohlsen, K. (2011) Functional antibodies targeting IsaA of *Staphylococcus aureus* augment host immune response and open new perspectives for antibacterial therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **55**, 165-173.
 - Schenk, U., Frascoli, M., Proietti, M., Geffers, R., Traggiai, E., Buer, J., Ricordi, C., Westendorf, A.M., & Grassi, F. (2011) ATP inhibits the generation and function of regulatory T cells through the activation of purinergic P2X receptors. *Science Signaling* **4**, ra12.
 - Kusch, K., Hanke, K., Holtfreter, S., Schmutte, M., Kohler, C., Erck, C., Wehland, J., Hecker, M., Ohlsen, K., Bröker, B., & Engelmann, S. (2011) The influence of SaeRS and σ^B on the expression of superantigens in different *Staphylococcus aureus* isolates. *International Journal of Microbiology*, in press.
 - TrehanPati, N., Sukriti, S., Geffers, R., Hissar, S., Riese, P., Toepfer, T., Buer, J., Adams, D.H., Guzmán, C.A.*., & Sarin, S.K. (2011) Acute and resolving phase of HEV infected patients and its cellular immune and global gene expression patterns. *Journal of Clinical Immunology*, in press.
- Frühere AG Zytoskelett Dynamik | Prof. Dr. Klemens Rottner**
- Hanisch, J., Ehinger, J., Ladwein, M., Rohde, M., Derivery, E., Bosse, T., Steffen, A., Bumann, D., Misselwitz, B., Hardt, W.D., Gautreau, A., Stradal, T.B.*., & Rottner, K. (2010) Molecular dissection of Salmonella-induced membrane ruffling versus invasion. *Cellular Microbiology* **12**, 84-98.
 - Hertzog, M., Milanese, F., Hazelwood, L., Disanza, A., Liu, H., Perlade, E., Malabarba, M.G., Pasqualato, S., Maiolica, A., Confalonieri, S., Le, C.C., Offenhauser, N., Block, J., Rottner, K., Di Fiore, P.P., Carlier, M.F., Volkmann, N., Hanein, D., & Scita, G. (2010) Molecular basis for the dual function of Eps8 on actin dynamics: bundling and capping. *PLoS Biology* **8**, e1000387.
 - Klink, B.U., Barden, S., Heidler, T.V., Borchers, C., Ladwein, M., Stradal, T.B.*., Rottner, K., & Heinz, D.W.*. (2010) Structure of Shigella IpgB2 in complex with human RhoA: implications for the mechanism of bacterial guanine nucleotide exchange factor mimicry. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 17197-17208.
 - Marg, S., Winkler, U., Sestu, M., Himmel, M., Schönherr, M., Bar, J., Mann, A., Moser, M., Mierke, C.T., Rottner, K., Blessing, M., Hirrlinger, J., & Ziegler, W.H. (2010) The vinculin-DeltaIn20/21 mouse: characteristics of a constitutive, actin-binding deficient splice variant of vinculin. *PLoS ONE* **5**, e11530.
 - Rottner, K., Hanisch, J., & Campellone, K.G. (2010) WASH, WHAMM and JMY: regulation of Arp2/3 complex and beyond. *Trends in Cell Biology* **20**, 650-661.
 - Jackson, B., Peyrollier, K., Pedersen, E., Basse, A., Karlsson, R., Wang, Z., Lefever, T., Ochsenbein, A.M., Schmidt, G., Aktories, K., Stanley, A., Quondamatteo, F., Ladwein, M., Rottner, K., van, H.J., & Brakebusch, C. (2011) RhoA is dispensable for skin development, but crucial for contraction and directed migration of keratinocytes. *Molecular Biology of the Cell* **22**, 593-605.
- Frühere AG Signaltransduktion und Motilität | Prof. Dr. Theresia Stradal**
- Hanisch, J., Ehinger, J., Ladwein, M., Rohde, M., Derivery, E., Bosse, T., Steffen, A., Bumann, D., Misselwitz, B., Hardt, W.D., Gautreau, A., Stradal, T.B.*., & Rottner, K. (2010) Molecular dissection of Salmonella-induced membrane ruffling versus invasion. *Cellular Microbiology* **12**, 84-98.
 - Klink, B.U., Barden, S., Heidler, T.V., Borchers, C., Ladwein, M., Stradal, T.B.*., Rottner, K., & Heinz, D.W.*. (2010) Structure of Shigella IpgB2 in complex with human RhoA: implications for the mechanism of bacterial guanine nucleotide exchange factor mimicry. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 17197-17208.
 - Stradal, T.B.*. & Backert, S. (2010) Host-pathogen interaction: How EHEC influence the actin cytoskeleton of the host cell [Wirt-Pathogen-Interaktion wie EHEC das Aktinzytoskelett der Wirtszelle beeinflussen]. *Biospektrum* **16**, 624-627.
 - Tahirovic, S., Hellal, F., Neukirchen, D., Hindges, R., Garvalov, B.K., Flynn, K.C., Stradal, T.E.*., Chrostek-Grashoff, A., Brakebusch, C., & Bradke, F. (2010) Rac1 regulates neuronal polarization through the WAVE complex. *Journal of Neuroscience* **30**, 6930-6943.

- Breitsprecher,D., Kiesewetter,A.K., Linkner,J., Vinzenz,M., Stradal,T.E.*., Small,J.V., Curth,U., Dickinson,R.B., & Faix,J. (2011) Molecular mechanism of Ena/VASP-mediated actin-filament elongation. *Embo Journal* **30**, 456-467.

Frühere AG System- und Synthetische Biologie | Prof. Dr. Vitor Martins dos Santos

- Fazzini,R.A., Preto,M.J., Quintas,A.C., Bielecka,A., Timmis,K.N.*., & dos Santos,V.A.P.M.*. (2010) Consortia modulation of the stress response: proteomic analysis of single strain versus mixed culture. *Environmental Microbiology* **12**, 2436-2449.
- Koutinas,M., Kiparissides,A., Lam,M.-C., Silva-Rocha,R., de Lorenzo,V., dos Santos,V.A.P.M.*., Pistikopoulos,E.N., & Mantalaris,A. (2010) Combining genetic circuit and microbial growth kinetic models: A challenge for biological modelling. *Computer Aided Chemical Engineering* **28**, 301-306.
- Koutinas,M., Lam,M.C., Kiparissides,A., Silva-Rocha,R., Godinho,M., Livingston,A.G., Pistikopoulos,E.N., de,L., V, Dos,S.V., & Mantalaris,A. (2010) The regulatory logic of m-xylene biodegradation by *Pseudomonas putida* mt-2 exposed by dynamic modelling of the principal node Ps/Pr of the TOL plasmid. *Environmental Microbiology* **12**, 1705-1718.
- Lam,C.M.C., Puchalka,J., Diez,M.S., & dos Santos,V.A.P.M.*. (2010) Exploring networks at the genome scale. *European Biotechnology Science and Industry News* **9**, 40-42.

Abt. für Mikrobielle Naturstoffe – HIPS & AG Mikrobielle Wirkstoffe – HZI | Prof. Dr. Rolf Müller

- Arp,G., Bissett,A., Brinkmann,N., Cousin,S., de Beer,D., Friedl,T., Mohr,K.I.*., Neu,T.R., Reimer,A., Shiraishi,F., Stackebrandt,E., & Zippel,B. (2010) Tufa-forming biofilms of German karstwater streams: Microorganisms, exopolymers, hydrochemistry and calcification. *Geological Society Special Publication* **336**, 83-118.
- Binz,T.M., Maffioli,S.I., Sosio,M., Donadio,S., & Müller,R. (2010) Insights into an unusual nonribosomal peptide synthetase biosynthesis: identification and characterization of the GE81112 biosynthetic gene cluster. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 32710-32719.
- Brodmann,T., Janssen,D., Sasse,F., Irschik,H., Jansen,R., Müller,R., & Kalesse,M. (2010) Isolation and synthesis of chivotriene, a chivosazole shunt product from *Sorangium cellulosum*. *European Journal of Organic Chemistry* **27**, 5155-5159.
- Bulow,L., Nickeleit,I., Girbig,A.K., Brodmann,T., Rentsch,A., Eggert,U., Sasse,F., Steinmetz,H., Frank,R., Carlomagno,T., Malek,N.P., & Kalesse,M. (2010) Synthesis and biological characterization of argyrin F. *ChemMedChem* **5**, 832-836.
- Buntin,K., Irschik,H., Weissman,K.J., Luxenburger,E., Blöcker,H., & Müller,R. (2010) Biosynthesis of thuggacins in myxobacteria: comparative cluster analysis reveals basis for natural product structural diversity. *Chemistry and Biology* **17**, 342-356.
- Buntin,K., Weissman,K.J., & Müller,R. (2010) An unusual thioesterase promotes isochromanone ring formation in ajudazol biosynthesis. *ChemBioChem* **11**, 1137-1146.
- Chai,Y., Pistorius,D., Ullrich,A., Weissman,K.J., Kazmaier,U., & Müller,R. (2010) Discovery of 23 natural tubulysins from *Angiococcus disciformis* An d48 and *Cystobacter* SBCb004. *Chemistry and Biology* **17**, 296-309.
- Daum,M., Schnell,H.J., Herrmann,S., Gunther,A., Murillo,R., Müller,R., Bisel,P., Müller,M., & Bechthold,A. (2010) Functions of genes and enzymes involved in phenalinolactone biosynthesis. *ChemBioChem* **11**, 1383-1391.
- Erol,O., Schaberle,T.F., Schmitz,A., Rachid,S., Gurgui,C., El,O.M., Lohr,F., Kehraus,S., Piel,J., Müller,R., & König,G.M. (2010) Biosynthesis of the myxobacterial antibiotic coralporonyrin A. *ChemBioChem* **11**, 1253-1265.
- Garcia,R., Gerth,K., Stadler,M., Dogma,I.J., Jr., & Müller,R. (2010) Expanded phylogeny of myxobacteria and evidence for cultivation of the 'unculturables'. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **57**, 878-887.
- Irschik,H., Kopp,M., Weissman,K.J., Buntin,K., Piel,J., & Müller,R. (2010) Analysis of the sorangicin gene cluster reinforces the utility of a combined phylogenetic/retrobiosynthetic analysis for deciphering natural product assembly by trans-AT PKS. *ChemBioChem* **11**, 1840-1849.
- Khatri,Y., Hannemann,F., Ewen,K.M., Pistorius,D., Perlova,O., Kagawa,N., Brachmann,A.O., Müller,R., & Bernhardt,R. (2010) The CYPome of *Sorangium cellulosum* So ce56 and identification of CYP109D1 as a new fatty acid hydroxylase. *Chemistry and Biology* **17**, 1295-1305.
- Kunze,B., Reck,M., Dotsch,A., Lemme,A., Schummer,D., Irschik,H., Steinmetz,H., & Wagner-Döbler,I. (2010) Damage of *Streptococcus mutans* biofilms by carolacton, a secondary metabolite from the myxobacterium *Sorangium cellulosum*. *BMC Microbiology* **10**, 199.
- Li,Y., Weissman,K.J., & Müller,R. (2010) Insights into multienzyme docking in hybrid PKS-NRPS megasynthetases revealed by heterologous expression and genetic engineering. *ChemBioChem* **11**, 1069-1075.
- Menche,D., Li,P., & Irschik,H. (2010) Design, synthesis and biological evaluation of simplified analogues of the RNA polymerase inhibitor etnangien. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **20**, 939-941.
- Nawrath,T., Gerth,K., Müller,R., & Schulz,S. (2010) The biosynthesis of the aroma volatile 2-methyltetrahydrothiophen-3-one in the bacterium *Chitinophaga Fx7914*. *ChemBioChem* **11**, 1914-1919.
- Nawrath,T., Gerth,K., Müller,R., & Schulz,S. (2010) Volatile methyl esters of medium chain length from the bacterium *Chitinophaga Fx7914*. *Chemistry and Biodiversity* **7**, 2228-2253.
- Nicolas,L., Anderl,T., Sasse,F., Steinmetz,H., Jansen,R., Höfle,G., Laschat,S., & Taylor,R.E. (2010) Gephyronic Acid, a Missing Link between Polyketide Inhibitors of Eukaryotic Protein Synthesis (Part I): Structural Revision and Stereochemical Assignment of Gephyronic Acid. *Angewandte Chemie International Edition* **50**, 938-941.
- Rachid,S., Revermann,O., Dauth,C., Kazmaier,U., & Müller,R. (2010) Characterization of a novel type of oxidative decarboxylase involved in the biosynthesis of the styryl moiety of chondrochloren from an acylated tyrosine. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 12482-12489.
- Vilchez,R., Lemme,A., Ballhausen,B., Thiel,V., Schulz,S., Jansen,R., Sztajer,H., & Wagner-Döbler,I. (2010) *Streptococcus mutans* inhibits *Candida albicans* hyphal formation by the fatty acid signaling molecule trans-2-decenoic acid (SDSF). *ChemBioChem* **11**, 1552-1562.
- Weissmann,K.J. & Müller,R. (2010) Myxobacterial secondary metabolites: Bioactivities and modes-of-action. *Natural Product Reports* **27**, 1276-1295.
- Adhikary,T., Kaddatz,K., Finkernagel,F., Schonbauer,A., Meissner,W., Scharfe,M., Jarek,M., Blöcker,H., Müller-Brüsselbach,S., & Müller,R. (2011) Genomewide analyses define different modes of transcriptional regulation by peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta (PPARbeta/delta). *PLoS ONE* **6**, e16344.
- Capell,A., Liebscher,S., Fellerer,K., Brouwers,N., Willem,M., Lammich,S., Gijssels,I., Bittner,T., Carlson,A.M., Sasse,F., Kunze,B., Steinmetz,H., Jansen,R., Dormann,D., Slegers,K., Cruts,M., Herms,J., Van,B.C., & Haass,C. (2011) Rescue of progranulin deficiency associated with frontotemporal lobar degeneration by alkalizing reagents and inhibition of vacuolar ATPase. *Journal of Neuroscience* **31**, 1885-1894.

- Dehn,R., Katsuyama,Y., Weber,A., Gerth,K., Jansen,R., Steinmetz,H., Höfle,G., Müller,R., & Kirschning,A. (2011) Molecular basis of elansolid biosynthesis: evidence for an unprecedented quinone methide initiated intramolecular Diels-Alder cycloaddition / macrolactonization. *Angewandte Chemie* **50**, 532-536.
- Huntley,S., Hamann,N., Wegener-Feldbrugge,S., Treuner-Lange,A., Kube,M., Reinhardt,R., Klages,S., Müller,R., Ronning,C.M., Nierman,W.C., & Sogaard-Andersen,L. (2011) Comparative genomic analysis of fruiting body formation in *Myxococcales*. *Molecular Biology and Evolution* **28**, 1083-1097.
- Steinmetz,H., Gerth,K., Jansen,R., Schlager,N., Dehn,R., Reinecke,S., Kirschning,A., & Müller,R. (2011) Elansolid A, a unique macrolide antibiotic from *Chitinophaga sancti* isolated as two stable atropisomers. *Angewandte Chemie International Edition* **50**, 532-536.
- Wenzel,S.C. & Müller,R. (2011) Myxobacteria - Unique microbial secondary metabolic factories. In: *Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology*, Elsevier Science & Technology, Oxford, pp. 189-222.
- Anderl,T., Nicolas,L., Munkemer,J., Baro,A., Sasse,F., Steinmetz,H., Jansen,R., Hofle,G., Taylor,R.E., & Laschat,S. (2011) Gephyronic Acid, a Missing Link between Polyketide Inhibitors of Eukaryotic Protein Synthesis (Part II): Total Synthesis of Gephyronic Acid. *Angewandte Chemie International Edition*, in press.
- Garcia,R., Pistorius,D., Stadler,M., & Müller,R. (2011) Fatty acid Related Phylogeny of Myxobacteria as an Approach to Discover Polyunsaturated Omega-3/6 Fatty Acids. *Journal of Bacteriology*, in press.
- Okanya,P.W., Mohr,K.I., Gerth,K., Jansen,R., & Müller,R. (2011) Marinobacteriolines A-F, Pyrroloquinolines from *Ohtaekwangia kribbensis* (Bacteroidetes). *Journal of Natural Products*, in press.
- Pistorius,D., Ullrich,A., Lucas,S., Hartmann,R.W., Kazmaier,U., & Müller,R. (2011) Biosynthesis of 2-Alkyl-4(1H)-Quinolones in *Pseudomonas aeruginosa*: Potential for Therapeutic Interference with Pathogenicity. *ChemBioChem*, in press.
- Rachid,S., Huo,L., Herrmann,J., Stadler,M., Kopcke,B., Bitzer,J., & Müller,R. (2011) Mining the cinnabaramide biosynthetic pathway to generate novel proteasome inhibitors. *ChemBioChem*, in press.
- Zander,W., Gerth,K., Mohr,K.I., Kessler,W., Jansen,R., & Müller,R. (2011) Roimatacene, an antibiotic against gram-negative bacteria isolated from cystobacter Cb G35 (myxobacteria). *Chemistry - A European Journal*, in press.
- Gaschen,A., Lang,D., Kalberer,M., Savi,M., Geiser,T., Gazdhar,A., Lehr,C.-M., Bur,M., Dommen,J., Baltensperger,U., & Geiser,M. (2010) Cellular responses after exposure of lung cell cultures to secondary organic aerosol particles. *Environmental Science and Technology* **44**, 1424-1430.
- Henning,A., Schneider,M., Nafee,N., Muijs,L., Rytting,E., Wang,X., Kissel,T., Grafahrend,D., Klee,D., & Lehr,C.-M. (2010) Influence of particle size and material properties on mucociliary clearance from the airways. *Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery* **23**, 233-241.
- Henning,A., Hein,S., Schneider,M., Bur,M., & Lehr,C.-M. (2010) Pulmonary drug delivery: medicines for inhalation. *Handbook of Experimental Pharmacology* 171-192.
- Lehmann,A.D., Daum,N., Bur,M., Lehr,C.-M., Gehr,P., & Rothen-Rutishauser,B.M. (2010) An *in vitro* triple cell co-culture model with primary cells mimicking the human alveolar epithelial barrier. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **77**, 398-406.
- Leonard,F., Collnot,E.M., & Lehr,C.-M. (2010) A three-dimensional coculture of enterocytes, monocytes and dendritic cells to model inflamed intestinal mucosa *in vitro*. *Molecular Pharmaceutics* **7**, 2103-2119.
- Melero,A., Lehr,C.-M., Schafer,U.F., & Garrigues,T.M. (2010) Wistar rat skin as surrogate for human skin in nortriptyline hydrochloride patch studies. *International Journal of Pharmaceutics* **384**, 137-139.
- Muendoerfer,M., Schaefer,U.F., Koenig,P., Walk,J.S., Loos,P., Balbach,S., Eichinger,T., & Lehr,C.-M. (2010) Online monitoring of transepithelial electrical resistance (TEER) in an apparatus for combined dissolution and permeation testing. *International Journal of Pharmaceutics* **392**, 134-140.
- Neumeyer,A., Bukowski,M., Veith,M., Lehr,C.-M., & Daum,N. (2010) Interaction of nanoparticles and cells - cellular uptake and cytotoxic effects *in vitro*. In *Modern Polymeric Materials for Environmental Applications* (Pielichowski,K., ed), pp. 239-246. Cracow.
- Philippi,C., Loretz,B., Schaefer,U.F., & Lehr,C.-M. (2010) Telomerase as an emerging target to fight cancer - Opportunities and challenges for nanomedicine. *Journal of Controlled Release* **146**, 228-240.
- Reum,N., Fink-Straube,C., Klein,T., Hartmann,R.W.*, Lehr,C.-M., & Schneider,M. (2010) Multilayer coating of gold nanoparticles with drug-polymer coadsorbates. *Langmuir* **26**, 16901-16908.
- Rytting,E., Bur,M., Cartier,R., Bouyssou,T., Wang,X., Kruger,M., Lehr,C.-M., & Kissel,T. (2010) *In vitro* and *in vivo* performance of biocompatible negatively-charged salbutamol-loaded nanoparticles. *Journal of Controlled Release* **141**, 101-107.
- Santander-Ortega,M.J., Stauner,T., Loretz,B., Ortega-Vinuesa,J.L., Bastos-Gonzalez,D., Wenz,G., Schaefer,U.F., & Lehr,C.-M. (2010) Nanoparticles made from novel starch derivatives for transdermal drug delivery. *Journal of Controlled Release* **141**, 85-92.
- Hahn,T., Hansen,S., Neumann,D., Kostka,K.-H., Lehr,C.-M., Muys,L., & Schaefer,U.F. (2011) Infrared densitometry: A fast and non-destructive method for exact stratum corneum depth calculation for *in vitro* tape-stripping. *Skin Pharmacology and Physiology* **23**, 183-192.
- Hahn,T., Winkler,K., Lehr,C.-M., & Schäfer,U.F. (2011) Ointment bases and the rate of water loss of the skin [Salbengrundlagen und die Wasserabgaberate der Haut]. *Deutsche Apotheker Zeitung* **150**, 59-62.
- Hansen,S., Selzer,D., Schaefer,U.F., & Kasting,G.B. (2011) An extended database of keratin binding. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **100**, 1712-1726.
- Hein,S., Bur,M., Schaefer,U.F., & Lehr,C.-M. (2011) A new Pharmaceutical Aerosol Deposition Device on Cell Cultures (PADD OCC) to evaluate pulmonary drug absorption for metered dose dry powder formulations. *European Journal of Pharmacology and Biopharmacology* **77**, 132-138.

Abt. für Wirkstoff-Transport – HIPS | Prof. Dr. Claus-Michael Lehr

- Khvedelidze, M., Mdzinarashvili, T., Partskhaladze, T., Nafee, N., Schaefer, U.F., Lehr, C.-M., & Schneider, M. (2011) Calorimetric and spectrophotometric investigation of PLGA nanoparticles and their complex with DNA. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* **99**, 337-348.
 - Maurer, F., Daum, N., Schaefer, U.F., Lehr, C.-M., & Bauer, P. (2011) Plant genetic factors for iron homeostasis affect iron bioavailability in Caco-2 cells. *Food Research International* **43**, 1661-1665.
 - Patzelt, A., Richter, H., Knorr, F., Schafer, U., Lehr, C.-M., Dahne, L., Sterry, W., & Lademann, J. (2011) Selective follicular targeting by modification of the particle sizes. *Journal of Control Release* **150**, 45-48.
 - Schulze, C., Schaefer, U.F., Ruge, C.A., Wohlleben, W., & Lehr, C.-M. (2011) Interaction of metal oxide nanoparticles with lung surfactant protein A. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **77**, 376-383.
 - Heinzerling, L., Hartmann, R.W.*., Frotscher, M., & Neumann, D. (2011) Predicting putative inhibitors of 17beta-HSD1. *Molecular Informatics* **29**, 695-705.
 - Hille, U.E., Zimmer, C., Vock, C.A., & Hartmann, R.W.*. (2011) First selective CYP11B1 inhibitors for the treatment of cortisol-dependent diseases. *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2**, 2-6.
 - Marchais-Oberwinkler, S., Wetzel, M., Ziegler, E., Kruchten, P., Werth, R., Henn, C., Hartmann, R.W.*., & Frotscher, M. (2011) New drug-like hydroxyphenyl-naphthol steroid mimetics as potent and selective 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitors for the treatment of estrogen-dependent diseases. *Journal of Medicinal Chemistry* **54**, 534-547.
 - Oster, A., Klein, T., Henn, C., Werth, R., Marchais-Oberwinkler, S., Frotscher, M., & Hartmann, R.W.*. (2011) Bicyclic substituted hydroxyphenylmethanone type inhibitors of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase Type 1 (17 beta-HSD1): the role of the bicyclic moiety. *ChemMedChem* **6**, 476-487.
 - Stefanachi, A., Favia, A.D., Nicolotti, O., Leonetti, F., Pisani, L., Catto, M., Zimmer, C., Hartmann, R.W.*., & Carotti, A. (2011) Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Imidazolyl Derivatives of 4,7-Disubstituted Coumarins as Aromatase Inhibitors Selective over 17-alpha-Hydroxylase/C17-20 Lyase. *Journal of Medicinal Chemistry* **54**, 1613-1625.
 - Wetzel, M., Marchais-Oberwinkler, S., & Hartmann, R.W.*. (2011) 17beta-HSD2 inhibitors for the treatment of osteoporosis: Identification of a promising scaffold. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **19**, 807-815.
 - Yadav, M.R., Sabale, P.M., Giridhar, R., Zimmer, C., Hauptenthal, J., & Hartmann, R.W.*. (2011) Synthesis of some novel androstanes as potential aromatase inhibitors. *Steroids* **76**, 464-470.
- Abt. für Wirkstoff-Design und -Optimierung – HIPS | Prof. Dr. Rolf Hartmann**
- Gobbi, S., Zimmer, C.*., Belluti, F., Rampa, A., Hartmann, R.W.*., Recanatini, M., & Bisi, A. (2010) Novel highly potent and selective nonsteroidal aromatase inhibitors: synthesis, biological evaluation and structure-activity relationships investigation. *Journal of Medicinal Chemistry* **53**, 5347-5351.
 - Haller, F., Moman, E., Hartmann, R.W.*., Adamski, J., & Mindnich, R. (2010) Molecular framework of steroid/retinoid discrimination in 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and photoreceptor-associated retinol dehydrogenase. *Journal of Molecular Biology* **399**, 255-267.
 - Hu, Q., Yin, L., Jagusch, C., Hille, U.E., & Hartmann, R.W.*. (2010) Iso-propylidene substitution increases activity and selectivity of biphenylmethylene 4-pyridine type CYP17 inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* **53**, 5049-5053.
 - Hu, Q., Jagusch, C., Hille, U.E., Hauptenthal, J., & Hartmann, R.W.*. (2010) Replacement of imidazolyl by pyridyl in biphenylmethylenes results in selective CYP17 and dual CYP17/CYP11B1 inhibitors for the treatment of prostate cancer. *Journal of Medicinal Chemistry* **53**, 5749-5758.
 - Hu, Q., Negri, M., Olgen, S., & Hartmann, R.W. (2010) The role of fluorine substitution in biphenyl methylene imidazole-type CYP17 inhibitors for the treatment of prostate carcinoma. *ChemMedChem* **5**, 899-910.
 - Negri, M., Recanatini, M., & Hartmann, R.W.*. (2010) Insights in 17beta-HSD1 enzyme kinetics and ligand binding by dynamic motion investigation. *PLoS ONE* **5**, e12026.
 - Oster, A., Hinsberger, S., Werth, R., Marchais-Oberwinkler, S., Frotscher, M., & Hartmann, R.W.*. (2010) Bicyclic substituted hydroxyphenylmethanones as novel inhibitors of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (17beta-HSD1) for the treatment of estrogen-dependent diseases. *Journal of Medicinal Chemistry* **53**, 8176-8186.
 - Oster, A., Klein, T., Werth, R., Kruchten, P., Bey, E., Negri, M., Marchais-Oberwinkler, S., Frotscher, M., & Hartmann, R.W.*. (2010) Novel estrone mimetics with high 17beta-HSD1 inhibitory activity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **18**, 3494-3505.
 - Reum, N., Fink-Straube, C., Klein, T., Hartmann, R.W.*., Lehr, C.-M., & Schneider, M. (2010) Multilayer coating of gold nanoparticles with drug-polymer coadsorbates. *Langmuir* **26**, 16901-16908.
 - Zimmer, C., Hafner, M., Zender, M., Ammann, D., Hartmann, R.W.*., & Vock, C.A. (2010) N-(Pyridin-3-yl)benzamides as selective inhibitors of human aldosterone synthase (CYP11B2). *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **21**, 186-190.



Fotos von links nach rechts: Dr. Kurt Dittmar (vorne) und Dr. Werner Lindenmaier untersuchen Zellen für die Immuntherapie mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie | Der BioTechnikum-Bus des BMBF während der von OMNILAB organisierten Biotech-Messe auf dem HZI-Campus | Während der Eröffnungszeremonie des Symposiums "Networking and Technology Transfer", Bangkok, Thailand. In der 1. Reihe (von links) Dr. Peter Winter (InWEnt/GIZ), Prof. Dr. Visith Sitprija (Direktor des QSMI, Bangkok), Hr. Stefan Duppel (Stellvertretender Botschafter der Deutschen Botschaft in Bangkok), in der 2. Reihe links: Dr. Suparp Artjariyasripong (Vize-Governor von TISTR, Bangkok) Fotos: HZI, Scheibe (li) | OMNILAB (mi) | QSMI, Thai Red Cross (re)





Zahlen und Fakten

Prof. Dr. Rainer Jonas | Abteilung für Wissenschaftliche Information und Internationalisierung | rjo@helmholtz-hzi.de

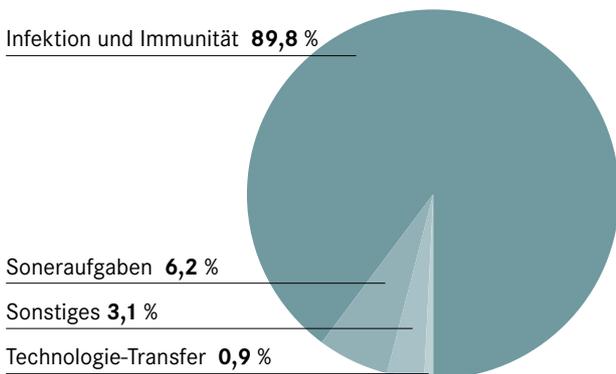
Das Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung (HZI) wurde 1965 als „Zentrum für Molekularbiologische Forschung,, (GMBF) mit finanzieller Unterstützung durch die Volkswagen-Stiftung gegründet. 1976 wurde sie durch das Bundesministerium für Forschung und Technologie (BMFT) sowie das Land Niedersachsen als Großforschungseinrichtung unter dem Namen „Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH“ (GBF) übernommen. Seit dem erfolgt die Finanzierung durch das BMFT/BMBF sowie dem Land Niedersachsen im Verhältnis 90:10. Seit 2002 wurde der Forschungsschwerpunkt auf das Gebiet der Infektionsforschung verlegt. Konsequenterweise erfolgte im Jahr 2006 die Umbenennung in Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung.

Forschungsfinanzierung Die Gesamtausgaben des HZI betragen im Jahr 2010 62,9 Mio €.

Kosten nach Programmen (in T€)

Forschungsbereich	Programm	Vollkosten
Gesundheit	Infektion und Immunität	56 460
Technologie-Transfer		580
Sonderaufgaben		3 901
Sonstiges		1 955
Gesamtsumme		62 896

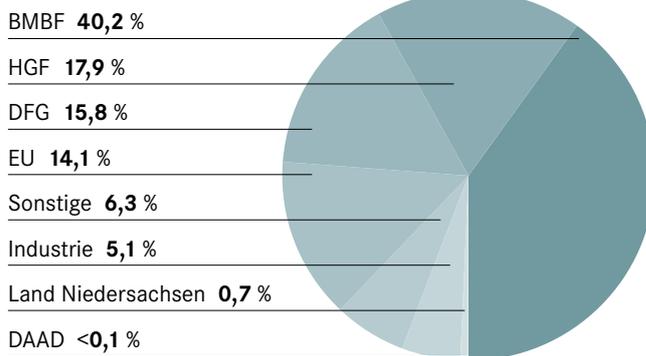
Vollkosten 2010



Drittmittelfinanzierung in der Forschung (in T€)

Herkunft	Vollkosten
BMBF	7 041,96
DFG	2 761,78
EU	2 465,56
Industrie	898,9
HGF	3 133,37
DAAD	3,33
Land Niedersachsen	128,33
Sonstige	1 105,28
Gesamtsumme	17 538,60

Drittmittelfinanzierung in der Forschung 2010 – nach Herkunft



Drittmittel-Förderung in der Forschung Mehr als 75% der Drittmittel kamen aus nationalen F&E-Programmen. Etwa 14% der Drittmittel konnten aus EU-Programmen erworben werden, während aus der Industrie 5% kamen.

Weitere Drittmittel in Höhe von 2,13 Mio € wurden für Infrastrukturmaßnahmen, einschließlich der Errichtung bzw. des Ausbaus von Gebäuden, ausgegeben. Die Gelder stammten u.a. aus dem Konjunkturprogramm II sowie von der Stadt Braunschweig.

Patente / Lizenzen Im Jahr 2008 wurden 6 Patente angemeldet, davon 5 im Ausland.

Patente und Lizenzen 2010

	Summe	DE	andere Länder
Prioritätsbegündete Anmeldungen (2008)	6	1	5
Bestand der lebenden Patentfamilien	102	35	67
Erteilte Patente (2010)	16	1	15
Gesamtbestand erteilter Patente u. lebender Patentfamilien	549	45	504
Lizenzvereinbarungen, Gesamtbestand	41	32	9
Lizenzeinnahmen* (in T€)	631	161	470

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

Veröffentlichungen, Berufungen, DFG-Programme, und Gastwissenschaftler Das HZI konnte seine Bedeutung durch hervorragende internationale Veröffentlichungen in den letzten Jahren weiter steigern. Eine Reihe von Aufsätzen wurde in den weltweit anerkannten Zeitschriften der *Science*-, *Nature*- und *Cell*-Gruppe publiziert (Näheres siehe unter der Rubrik „Veröffentlichungen“ im Abschnitt „Wissenschaftlicher Ergebnisbericht“).

Viele HZI-Wissenschaftler sind an wichtigen nationalen wie internationalen Forschungsprogrammen beteiligt.

Teilnahme von HZI-Wissenschaftlern an bedeutenden nationalen und internationalen Forschungsprogrammen

Quantitative Parameter	Art	2008	2009	2010
Veröffentlichungen	Veröffentlichungen in ISI-registrierten Zeitschriften	205	239	323
	Aufsätze, Peer-reviewed, in nicht-ISI-Zeitschriften	5	11	72
	Gesamtzahl	210	250	395
Habilitationen		2	1	4
Dissertationen		40	34	40
Doktoranden		219	223	291
Berufungen (W2/W3)	Berufungen an Universitäten	4	7	2
	Gesamtzahl	13	14	19
DFG-Progr.	DFG-SFBs, Transregios	8	8	9
	DFG-Schwerpunktprogramme (SPP)	2	3	3
	Gesamtzahl	13	14	19
Graduiertenkollegs		3	4	4
Gastwissenschaftler		98	87	123

BMBF	
AiF-Dechema	Zelluläre Screeningsysteme
Basisinnovationen Genomforschung	Candida Therapie
Basisinnovationen Genomforschung	Tuberkulose Therapie
Bioprofile	TransMedLab
ERA-Net	SPATELIS
ERA-Net	METAGUT
ERA-Net	LISTRESS
FORSYS	Stoffwechselbilanz in <i>E. coli</i>
FORSYS	„T cell Talk“
FORSYS	SysLogics
GenoMik	ProTumor
GenoMik – Transfer	MiPro
GenoMik – Transfer	ExpressSys
GerontoSys	GerontoMitoSys
GerontoSys	GerontoSHIELD
InnoNet	InnoSurf
Innovative Therapien	Bewaffnete Bakterien
KMU, innovativ	De novo – Gencluster-Synthese
KMU, innovativ	Dis-Z-Konjugate
Medizinische Infektionsgenomik	Nasale Metagenomik
Medizinische Infektionsgenomik	Metagenom und Interaktom
Medizinische Infektionsgenomik	LegioProtect
MedSys	Jekyll & Hyde
MedSys	BioInSys
NGFN Plus	Deutsche Mauslinik
NGFN Plus	Adipositas Network
Spitzenforschung Neue Länder	Taschentuchlabor
Empfänglichkeit und Resistenz	SkinStaph
Empfänglichkeit und Resistenz	PROGRESS
Empfänglichkeit und Resistenz	„Resistance Susceptibility“
Empfänglichkeit und Resistenz	SkinStaph2
SysMO	PSYSMO
Zoonosis	Zoo MAP
Zoonosis	PBA-Zoo
Zoonosis	Influenza
Zoonosis	ZooMAP2
Zoonosis	Influenza 2
Zoonosis	FBI-Zoo II

Graduiertenkollegs	
Helmholtz Graduiertenschule für Infektionsforschung	HIGS
Helmholtz-Kolleg für Infektionsbiologie	H-IRISIB
DFG-Graduiertenkolleg GRK 653	“Pseudomonas“
DFG-Graduiertenkolleg GRK 1273	“Chronical Infections“

EU Rahmenprogramme	
CA	CASIMIR
COST	Sysgenet
CP	FAST-XDR-DETECT
CP	FLUINHIBIT
CP	BACSIN
CP	HEPTROMIC
CP	OPTISTEM
CP	MagicPAH
CP	CAREPNEUMO
CSA	TARPOL
ERC StG	RESISTOME
ERC StG	CMVAgSTIMULUS
IMI	EMTRAIN
Infrastrukturen	EATRIS
Infrastrukturen	Infrafrontier
Infrastrukturen	ProteomeBinders
Infrastrukturen	Instruct
Infrastrukturen	TRANSVAC
Infrastrukturen	EU-Openscreen
IP	EUMODIC
Marie Curie IOF	APPI
NoE	EuroPathoGenomics EPG
NoE	Clinigene
SME driven	NOPERSIST
STREP	Healthy-Water
STREP	ASSIST
STREP	Fastest TB
STREP	PANFLUVAC

Technologie-Transfer Im HZI besteht ein großes Potenzial an der Entwicklung innovativer Produkte, Verfahren und Dienstleistungen, insbesondere in Kooperation mit industriellen Partnern. Ein wichtiges Ziel des HZI ist es daher, die im Rahmen der Forschung erbrachten Ergebnisse durch Technologietransfer zur Anwendung zu bringen. Deshalb sind für das HZI Ausgründungen von Firmen, Lizenzvergabe, Service und Dienstleistungen im Rahmen von Industriekooperationen wichtige Parameter für die Umsetzbarkeit ihrer F&E-Ergebnisse. Aus diesem Grund ist das HZI Mitglied in Vereinigungen wie BioRegion und dem Transferkolleg Biotechnologie e.V..

Der HZI-Wissenschaftscampus Ein neuer Container, in dem die Administration untergebracht ist, wurde in 2009 aufgestellt. Ebenso ist ein neues S3-Labor zum Bezug fertig gestellt worden. Das Laborgebäude D bekommt derzeit einen neuen Anbau für Büroarbeitsplätze für die Wissenschaftler, der Ende 2011 bezogen werden soll.

DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft)	
SFB 566	Zytokinrezeptoren
SFB 578	Vom Gen zum Produkt
SFB 587	Lungenimmunität
SFB 599	Dauerimplantate
SFB 621	Pathobiologie der Darmmukosa
SFB 738	Optimierung konventioneller und innovativer Transplante
SFB 854	Molekulare Organisation zellulärer Kommunikation im Immunsystem
SFB 900	Chronische Infektionen: Microbielle Persistenz und seine Kontrolle
SFB/TR 51	Ökologie, Physiologie und Molekularbiologie der Roseobacter-Gruppe
SPP 1258	“Sensory and regulatory RNAs in Prokaryotes”
SPP 1316	Wirtsadaptierter Metabolismus von bakteriellen Pathogenen
SPP 1394	Mastzellen – Promotoren der Gesundheit und Modulatoren von Krankheiten
EXC 62	ReBirth
FOR 629	Antikörper und Proteinanalyse
FOR 1220	PROTRAIN
FOR 1406	Bewertung des Potenzials von Naturstoffen: Myxobacteria
KFO 250	Genetische und zelluläre Mechanismen von Autoimmunkrankheiten

Technologieverwertung Seit 2002 bietet die *Ascenion GmbH* ihre Dienste in erster Linie vier Zentren der Helmholtz-Gemeinschaft im Bereich Gesundheitsforschung, DKFZ, GSF, HZI und MDC, an. Die Hauptgeschäftsstelle befindet sich in München, ein Büro mit zwei ständigen Mitarbeitern auf dem HZI-Campus.

Die Ascenion GmbH übernimmt folgende Aufgaben für das HZI:

- Erfindungsakquisition und Erfindungsbetreuung am HZI
- Technologiebewertung und Schutzrechtsanmeldung
- Konzeption von Verwertungsstrategien für angemeldete bzw. erteilte Schutzrechte mit NPV (Net Present Value) Berechnung



Ein wissenschaftlicher Vortrag während der von OMNILAB veranstalteten Biotech-Messe im HZI-FORUM im September 2010. Foto: OMNILAB

Biotech-Messe auf dem HZI-Gelände Zum 6. Mal organisierte die Firma OMNILAB eine kleine Biotech-Messe mit Symposium am 16. 9.2010 im HZI-FORUM. Es war gleichzeitig das 10-jährige Jubiläum dieser Veranstaltung und das 75-jährige Bestehen der Firma OMNILAB. Unterstützt wurde die Messe von HZI und DSMZ. Über 60 Aussteller einschließlich großer Forschungsinstitutionen der Region waren vertreten und mehr als 600 Besucher, ein neuer Rekord, kamen aus der Region Braunschweig–Hannover–Magdeburg–Göttingen. Ein spezieller Höhepunkt war der Bus „BIOTechnikum“ des BMBF. Die nächste Messe ist für den 20.9.2012 geplant.

ASAG-BioTech-Netzwerk Die Internetplattform des ASEAN-South American-German Biotechnetwork (www.asag-biotech.net) wurde weiter verbessert. Es ist jetzt möglich die meisten Institute in Deutschland im Bereich Biotechnologie *sensu latu* über Stichworteingabe zu finden. Außerdem kann man auch jeweils über 100 Institute in Lateinamerika und Südostasien dort finden und nach Industrien und Events suchen. Die Plattform gibt direkten Zugang zu den Seiten der wichtigsten deutschen Wissenschaftseinrichtungen, von Stipendiengebern und von „Calls“ zur Forschungsförderung. Die Publikationsdatenbanken der Helmholtz-Einrichtungen, mehrere Patentdatenbanken und die Seiten von Universitätsbibliotheken können gefunden werden. Im Juni 2010 organisierte das HZI zusammen mit InWEnt und anderen Partnern ein Symposium zum Thema „Arbeiten in Netzwerken und Technologie-Transfer“ in Bangkok, Thailand. Mehr als 150 Wissenschaftler aus Deutschland, Südostasien und dem Mercosur nahmen daran teil.



Prof. Dr. Yongyuth Yuthavong, ehemaliger Minister für Forschung und Technologie von Thailand und Professor am NSTDA, Thailand, während seines wissenschaftlichen Eröffnungsvortrags zum Thema „Aspekte der Zukunftsentwicklung in der Biotechnologie“ beim Symposium „Arbeiten in Netzwerken und Technologietransfer“, Bangkok, Juni 2010.

(Foto: QSMI, Thai Red Cross).

Tag der Offenen Tür am HZI Am Samstag, den 8. Mai 2010, öffnete das HZI seine Pforten für die Bevölkerung um sich vor Ort über die Aktivitäten des Zentrums zu informieren. Über 1800 Besucher aus der Region nutzten die Gelegenheit, sich detailliert über Infektionen, Impfstoffe, Biofilme u.v.a. zu informieren.



Dr. Torsten Lührs erklärt Besuchern des Tages der Offenen Tür 2010, wie ein Kernmagnetresonanzspektrometer funktioniert. Foto: HZI

Krippenbetreuung und Kindergarten Seit August 2006 bietet das Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Kooperation mit der Kita Sterntaler in Braunschweig-Stöckheim Krippenbetreuung und Kindergartenplätze für Kinder ab einem Jahr von 8.00 bis 17.00 Uhr an. Am Ende des Jahres 2010 besuchten 19 Kinder die Kita, davon 5 die Krippe und die übrigen 14 den Kindergarten.

Audit „berufundfamilie“ Am 27. November 2010 wurde das HZI für weitere 3 Jahre für das Programm zertifiziert.

Helmholtz-Mentorenprogramm 2010/2011 Im Jahr 2010 nahmen 3 Mitarbeiterinnen an dem Programm teil und für 2011 ist die Teilnahme von weiteren 5 vorgesehen.

Zukunftstag für Mädchen und Jungen Im Jahr 2011 haben rund 100 Schülerinnen und Schüler zwischen 12 und 16 Jahren aus den unterschiedlichsten Schulformen das HZI am Zukunftstag besucht. Fünfzehn verschiedene Arbeitsgruppen des HZI mit über 60 Mitarbeitern zeigten den Schulkindern interessante Experimente, zum Teil zum Mitmachen, oder gaben ihnen Ideen von der Arbeit am HZI.



Jungen und Mädchen sind sehr neugierig zu lernen, was das HZI in der Forschung macht. Foto: HZI

Personal Der Personalstand betrug am 31.12.2010 insgesamt 731 Personen in Voll- und Teilzeitbeschäftigung. Hinzu kamen 251 Gastwissenschaftler in verschiedenen Projekten, deren Bezahlung aus Drittmitteln außerhalb des HZI erfolgte. Neben 188 „Senior“-Wissenschaftlern waren fast 300 Doktoranden und 22 Ingenieure am HZI beschäftigt.

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

Gesellschafterversammlung In der Gesellschafterversammlung sind die drei Gesellschafter des HZI, die Bundesrepublik Deutschland, das Land Niedersachsen und das Saarland durch ihre jeweils federführenden Ressorts, das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF), das Niedersächsische Finanzministerium und das Wirtschaftsministerium des Saarlandes vertreten.

Aufsichtsrat Der Aufsichtsrat (AR) besteht aus höchstens 11 Mitgliedern. Er überwacht die Rechtmäßigkeit, Zweckmäßigkeit und Wirtschaftlichkeit der Geschäftsführung und entscheidet über die allgemeinen Forschungsziele sowie die wichtigen forschungspolitischen und finanziellen Angelegenheiten des Zentrums.

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

Geschäftsführer Die Geschäftsführer des HZI sind für den Bereich Wissenschaft und Forschung Prof. Dr. Dirk Heinz und für den Bereich Administration Ulf Richter, MBA.



Der Wissenschaftliche und der Administrative Geschäftsführer des HZI, Prof. Dr. Dirk Heinz (rechts) und Ulf Richter (links).

Foto: HZI

Mitglieder des Aufsichtsrats (AR) und des Wissenschaftlichen Komitees (WK), Stand: 19.01.2011

Funktion	Name, Titel	Organisation	Ort
Vorsitzender AR	Brumme-Bothe, MinDir'in Bärbel	BMBF	Berlin
Stellvertr. Vors. AR	Gevers, MinDirig Dr. Heiko	NMWK	Hannover
AR	Köpke, OR Heinz-Hermann	Finanzministerium, Niedersachsen	Hannover
AR + WK	Baum, Prof. Dr. Christopher	MHH	Hannover
AR	Dersch, Prof. Dr. Petra	HZI	Braunschweig
AR	Weiß, Dr. Siegfried	HZI	Braunschweig
AR + WK	Zettlmeissl, Dr. Gerd	Intercell AG	Wien
AR + WK	Müller-Goymann, Prof. Dr. Christel	TU	Braunschweig
AR + WK, stellvertr. Vors. WK	Schendel, Prof. Dr. Dolores	HMGU	München
AR + WK	Kurth, Dr. Bärbel-Maria	Robert-Koch-Institut	Berlin
AR + WK	Daniel, Prof. Dr. Hannelore	Wissenschaftszentrum Weihenstephan	Freising
AR + WK, Vorsitzender WK	Pfeffer, Prof. Dr. med. Klaus	Universitätsklinikum	Düsseldorf
WK	Hacker, Prof. Dr. Jörg	Nationale Akademie der Wissenschaften	Halle
WK	Rosenthal, Prof. Dr. Walter	MDC	Berlin
WK	Brakhage, Prof. Dr. Axel	HKI	Jena
WK	Apweiler, Dr. Rolf	EBI	Cambridge
WK	Wilmanns, Dr. Matthias	EMBL	Hamburg
WK	Hakenbeck, Prof. Dr. Regine	TU	Kaiserslautern
WK	Hämmerling, Prof. Dr. Günter	DKFZ	Heidelberg
WK	Di Santo, Prof. Dr. James	Institut Pasteur	Paris

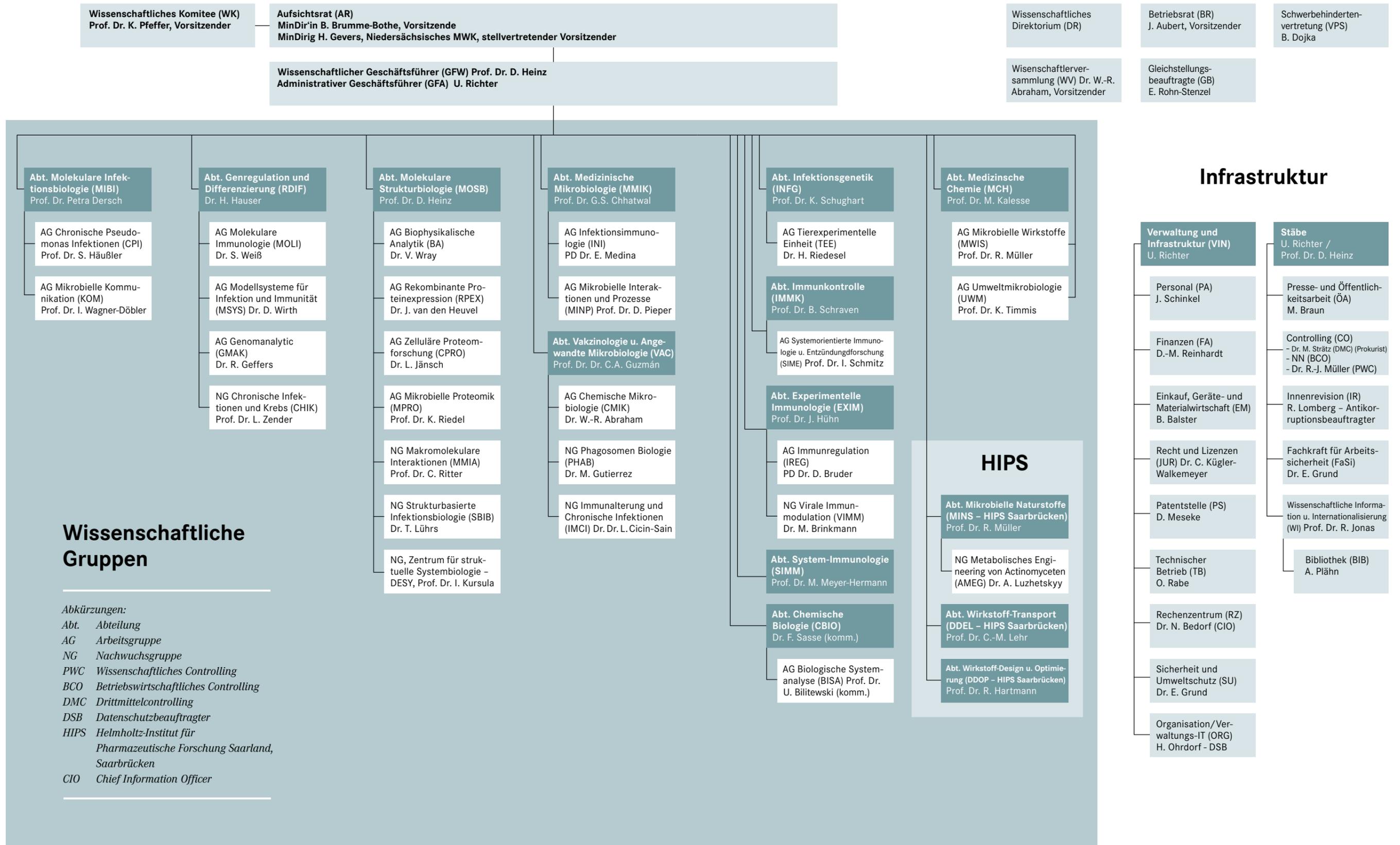
Wissenschaftlicher Beirat Der Wissenschaftliche Beirat (WB) des HZI berät die Geschäftsführung in wissenschaftlichen Fragen. Es besteht zur Hälfte aus den Leitern der Abteilungen und zur anderen Hälfte aus gewählten Mitgliedern aus den Reihen der Arbeitsgruppenleitern Nachwuchsgruppenleitern. Die Geschäftsführung, die Mitglieder des Lenkungsausschusses, ein Vertreter des Betriebsrats und ein Vertreter der Administration, benannt durch den Administrativen Geschäftsführer, sind Gäste des WB.

Lenkungsausschuss Der Lenkungsausschuss berät die Geschäftsführung in allen wichtigen Angelegenheiten des HZI. Ihm gehören neben der Geschäftsführung der Programmsprecher sowie die Themensprecher an.

Betriebsrat Dem Betriebsrat gehören derzeit 11 Mitglieder an. Vorsitzender ist Herr John Aubert.

Gleichstellungsbeauftragte im Berichtszeitraum war Frau Evelyn Rohn-Stenzel.

Organisationsdiagramm, Stand 01. Februar 2011



Forschungsbericht 2010/11

Herausgegeben vom
Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung GmbH (HZI)
Inhoffenstraße 7
D-38124 Braunschweig
Telefon +49 (0)531-61 81-0
Telefax +49 (0)531-61 81-2655
info@helmholtz-hzi.de | www.helmholtz-hzi.de

Mitglied der Helmholtz-Gemeinschaft Deutscher Forschungszentren

Verantwortlicher Herausgeber: Prof. Dr. Rainer Jonas (V.i.S.d.P.) | rjo@helmholtz-hzi.de

Redaktionsassistentz: Monica Kirchner | Dr. Bastian Dornbach | Dr. Clemens Ostrowicz

Textbearbeitung: Dr. Jo Schilling | buero@jo-schilling.de

Übersetzungen: ADREM Sprachdienstleistungen sowie Ronning Übersetzungsdienst (Twincore)

© 2011 HZI Braunschweig

Fotografien:

Die Portraits und weitere Fotos wurden aufgenommen von:

Bierstedt – Seiten: 48, 71, 80, 90, 91, 98, 106, 111, 113, 127-129, 172

Dornbach – Seiten: 30, 35, 39, 118

Gramann – Seiten: 7, 9, 19, 22, 28, 42, 44, 64, 69, 73, 74, 77, 84, 97, 102, 103, 108, 110, 119,
132, 138, 175, 176

Hans – Seiten: 79, 86, 89

Hübner – Seiten: 114, 175

Krämer – Seiten: 15, 30, 34, 40, 74, 76, 85, 88, 94-96, 99, 104, 112, 115, 117, 126

Sondermann – Seite: 5

HZI-Sammlung – Seiten: 2, 52, 59, 60, 67, 70, 72, 78, 81, 87, 93, 105, 107, 112, 122, 124, 130, 131

HIPS-Sammlung – Seiten: U2, U4, 2, 36, 39, 40, 125

Twincore-Sammlung – Seiten: U1, U2, 2

Die folgenden Portraits wurden durch die Autoren zur Verfügung gestellt – Seiten:

28 (Ciesek), 28 (Steinmann), 40 (Schäfer), 75 (Dersch), 92 (Hühn), 105 (Zender),

116 (Meyer-Hermann), 120 (Riedel), 123 (Kursula)

Bei allen übrigen Fotos sind die Institutionen (Sammlungen) bzw. Fotografen unterhalb der Legenden erwähnt.

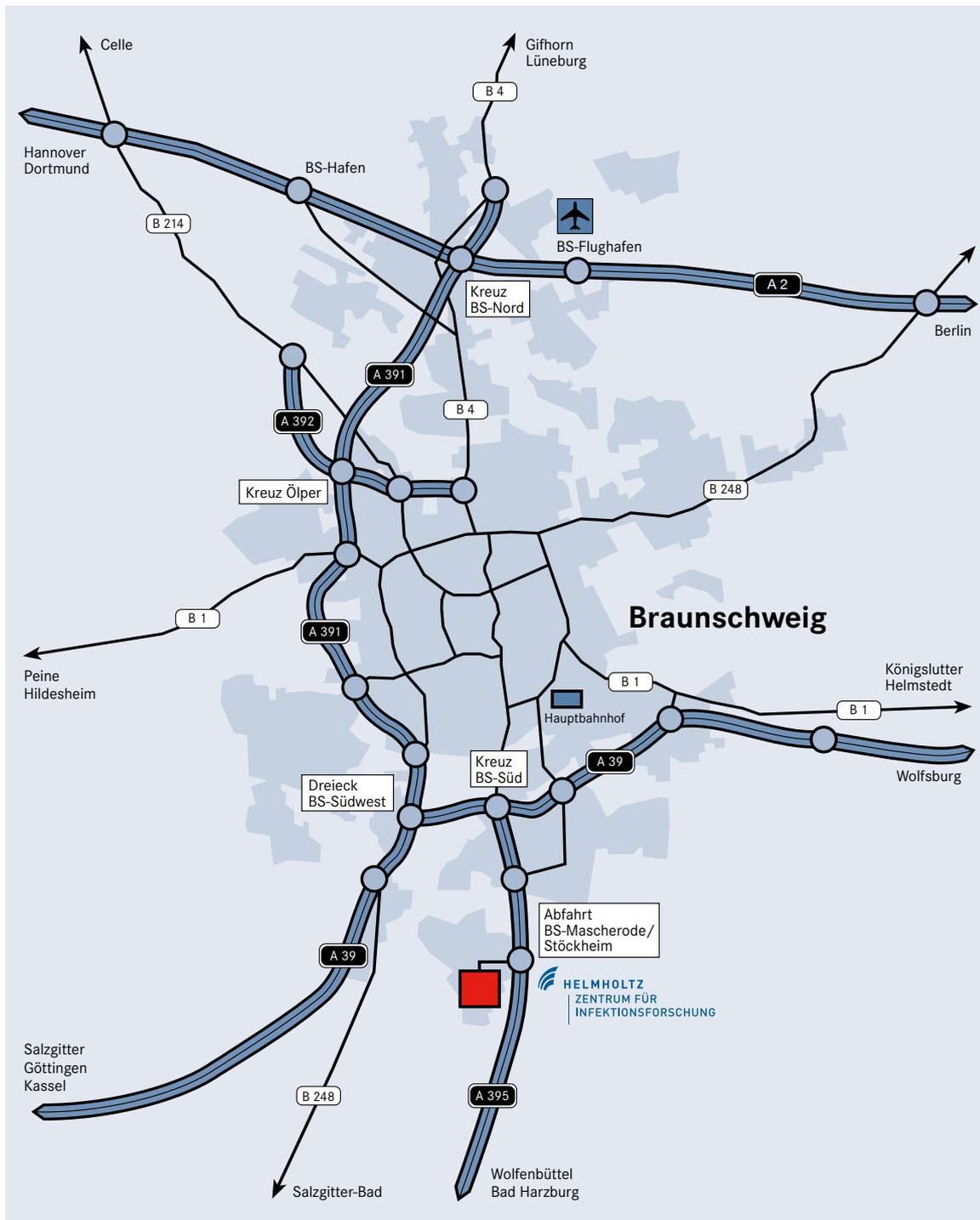
Layout und Gestaltung:

UNRUH Designbüro, Braunschweig
unruh@unruhdesign.de | www.unruhdesign.de

Herstellung:

döringDRUCK | Druckerei und Verlag GmbH
Koppestraße 6 | 38104 Braunschweig

ISSN 1865-9713



Lageplan des Helmholtz-Zentrums für Infektionsforschung

ISSN 1865-9713

Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung GmbH
Inhoffenstraße 7 | D-38124 Braunschweig
www.helmholtz-hzi.de | info@helmholtz-hzi.de

