

GenoMik-Kompetenznetzwerk Würzburg



GenoMik-Kompetenznetzwerk Würzburg: Genomforschung an pathogenen Mikroorganismen – PathoGenoMik

Werner Goebel und Michael Kuhn

Bakterien sind allgegenwärtige Begleiter des Menschen und von nicht zu unterschätzender Bedeutung für die verschiedensten Aspekte menschlichen Lebens. Bakterien sind die Ursache für eine nach wie vor riesige Zahl von Krankheits- und Todesfällen weltweit und können – wie die verheerenden Pestepidemien im Europa des ausgehenden Mittelalters gezeigt haben – durchaus zur Verwüstung und Entvölkerung ganzer Landstriche beitragen.

Im Mittelpunkt der Forschung des von der Universität Würzburg koordinierten Kompetenznetzwerks „Genomforschung an pathogenen Mikroorganismen – PathoGenoMik“ stehen eine ganze Reihe von Bakterien die – trotz aller Fortschritte der modernen Medizin – nach wie vor bedeutende Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit haben. Gerade auch durch das immer häufigere Auftreten von bakteriellen Krankheitserregern die gegen die heute vorhandenen Antibiotika resistent geworden sind, werden pathogene Bakterien auch in Zukunft eine Herausforderung für die medizinische Forschung darstellen. Als zwei Beispiele aus der langen Liste der im Rahmen von PathoGenoMik bearbeiteten pathogenen Bakterien seien hier nur *Mycobacterium tuberculosis* und *Helicobacter pylori* genannt. *M.*

tuberculosis, der Erreger der Tuberkulose, ist ein schon sehr lange bekanntes Bakterium, das nach wie vor etwa ein Drittel aller Menschen weltweit infiziert und für weit mehr als eine Million Todesfälle jährlich verantwortlich ist und auch bei uns in den vergangenen Jahren wieder verstärkt aufgetreten ist. *H. pylori*, ein Bakterium, das etwa die Hälfte der Weltbevölkerung infiziert, wurde erst vor zwei Jahrzehnten entdeckt. *H. pylori* ist ein Besiedler der Magenschleimhaut, deren Infektionen zunächst relativ mild verlaufen, aber nach Jahrzehnten der Persistenz schließlich Magengeschwüre und sogar Magenkarzinome verursachen können.

Um dem nach wie vor aktuellen Problem der bakteriellen Infektionserkrankungen zukünftig noch besser begegnen zu können, sollen die von den Wissenschaftlern des Kompetenznetzes PathoGenoMik gemachten Entdeckungen nicht nur der Grundlagenforschung dienen. Es ist ein besonderes Ziel aller Netzwerke, durch eine enge Kooperation mit kleinen und großen Industrieunternehmen, diese Ergebnisse gezielt und rasch einer praktischen Verwertung zuzuführen und somit nicht nur den Forschungsstandort sondern auch den Wirtschaftsstandort Deutschland nachhaltig zu fördern.

Die folgenden vierzehn Highlights geben einen Überblick über das in der ersten und zweiten Förderphase vom Netzwerk PathoGenoMik bisher Erreichte. In der jetzt laufenden zweiten Förderperiode soll ganz besonders die Verwertung der bisher erzielten Erkenntnisse intensiviert werden, um neben dem schon jetzt sichtbaren wissenschaftlichen auch den medizinischen und wirtschaftlichen Erfolg der Initiative zu belegen. Im Rahmen einer erwarteten zukünftigen Förderung der Genomforschung an Bakterien durch das BMBF innerhalb der Initiative „GenoMik-Plus“ wird auch die weitere Erforschung pathogener Bakterien und die Nutzbarmachung der zu erwartenden Ergebnisse eine zentrale Rolle spielen.

Kontakt

Prof. Dr. Werner Goebel, Sprecher
Lehrstuhl für Mikrobiologie
Universität Würzburg
E-mail: goebel@biozentrum.uni-wuerzburg.de

PD Dr. Michael Kuhn, Geschäftsführer
Kompetenzzentrum PathoGenoMik
Universität Würzburg
E-mail: kuhn@biozentrum.uni-wuerzburg.de

Die erste Genomsequenz einer apathogenen Staphylokokkenspezies als Grundlage für die Identifizierung neuer Virulenzfaktoren.

Ralf Rosenstein, Christiane Nerz, Alexandra Resch, Guenter Raddatz, Stephan C. Schuster und Friedrich Götz

Innerhalb der Gattung *Staphylococcus* kommen mit *S. aureus* und *S. epidermidis* zwei der prominentesten Verursacher nosokomialer Infektionen vor. Die Bekämpfung dieser Erreger durch Antibiotika wird durch die rasche Ausbreitung multiresistenter Keime zunehmend schwieriger. Damit zeichnet sich eine äußerst bedrohliche Situation ab, die die Suche nach neuen Antiinfektiva und alternativen Möglichkeiten der Behandlung von durch Staphylokokken verursachten Infektionen zu einem dringlichen Ziel macht. Die Grundlage für die Identifizierung neuer Angriffspunkte für Antiinfektiva liegt in einer umfassenden Charakterisierung der Faktoren, die an der Ausprägung der Virulenz beteiligt sind.

Dies erklärt, warum die Staphylokokken bei den bis dato publizierten bakteriellen Genomsequenzen überproportional häufig vertreten sind: mittlerweile sind die Genome von sechs *S. aureus*-Stämmen, zwei Vertretern der Spezies *S. epidermidis* und von *S. haemolyticus* sequenziert worden. Trotz dieser großen Datenbasis wurde eine umfassende Lokalisierung von Kandidaten für neue Pathogenitätsgene durch komparative Analysen bislang dadurch verhindert, dass ausschließlich Genomsequenzen virulenter Staphylokokken bekannt waren.

Deshalb haben wir uns entschlossen, erstmals die Genomsequenz einer apathogenen Spezies zu bestimmen. Die Wahl fiel mit *Staphylococcus carnosus* TM300 auf einen Stamm, der als GRAS – für „generally recognized as safe“, als allgemein als sicher bekannter Organismus klassifiziert wurde (1). Die Sequenzierung des Genoms wurde im Rahmen des PathoGenomik-Netzwerkes finanziert und in Kooperation mit der MWG Biotech AG durchgeführt.

Das Genom von *S. carnosus* TM300 umfasst 2,56 Millionen Basenpaare und weist einen durchschnittlichen GC-Gehalt von 34,6% auf. In der Sequenz wurden 2474 offene Leseraster (ORF) lokalisiert. Der Vergleich der abgeleiteten Genprodukte ergab, dass ca. 30% der im Genom von *S. aureus* N315 kodierten Proteine keine homologen Äquivalente in *S. carnosus* TM300 aufweisen, und dass in dieser Gruppe nahezu 80% aller für *S. aureus* annotierten Virulenzfaktoren vorkommen. Dies belegt die Validität der differentiellen Genomanalyse von pathogenen und apathogenen Arten. In der Gruppe der für *S. aureus* N315 spezifischen Genprodukte finden sich mehr als ein Drittel der in dieser Spezies gefundenen hypothetischen Proteine. Diese sind damit vorrangig als Kandidaten für bis dato unentdeckte Virulenzfaktoren anzusehen.

Die Adhäsion an medizinische Implantate kann zu chronischen, Polymer-assoziierten Infektionen durch Biofilm-bildende *S. aureus*- oder *S. epidermidis*-Stämme führen. Damit stellt die Fähigkeit zur Bildung von Biofilmen ein prominentes Pathogenitätsmerkmal dar und steht im Fokus der Entwicklung neuer Antiinfektiva.

In unserer Arbeitsgruppe wurde eine vergleichende Transkriptomanalyse durchgeführt, um herauszufinden, welche Gene von *S. aureus* während der Bildung von Biofilmen signifikant stärker exprimiert werden (2). Von diesen während der Biofilmbildung induzierten Genen fallen 11 in die Gruppe der durch unsere Genomvergleiche postulierten Kandidatengene für neue Virulenzfaktoren und sind somit besonders interessant bezüglich der experimentellen Aufklärung ihrer Rolle bei der Biofilmbildung sowie ihrer Eignung als mögliche Targets für neue Behandlungsverfahren.

Dieses Beispiel zeigt die Bedeutung von komparativen Genomvergleichen auf der Basis des *S. carnosus*-Genoms als nützliches Werkzeug für die Vorauswahl von Virulenz-assoziierten Kandidatengenen, die neue Ansatzpunkte für die Entwicklung von Antiinfektiva darstellen können.

Dieses Beispiel zeigt die Bedeutung von komparativen Genomvergleichen auf der Basis des *S. carnosus*-Genoms als nützliches Werkzeug für die Vorauswahl von Virulenz-assoziierten Kandidatengenen, die neue Ansatzpunkte für die Entwicklung von Antiinfektiva darstellen können.

Dieses Beispiel zeigt die Bedeutung von komparativen Genomvergleichen auf der Basis des *S. carnosus*-Genoms als nützliches Werkzeug für die Vorauswahl von Virulenz-assoziierten Kandidatengenen, die neue Ansatzpunkte für die Entwicklung von Antiinfektiva darstellen können.

Literatur

- Götz. (1990) *Staphylococcus carnosus*: a new host organism for gene cloning and protein production. Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser. 19: 495-535
- Resch et al. (2005) Differential gene expression profiling of *Staphylococcus aureus* cultivated under biofilm and planktonic conditions. Appl. Environ. Microbiol. 71: 2663-2676.

Kontakt

Prof. Dr. Fritz Götz
Lehrstuhl für Mikrobielle Genetik
Universität Tübingen
E-mail: friedrich.götz@uni-tuebingen.de

Mit Gen-Chip-Analysen und Proteom-Untersuchungen den Ursachen von chronischen, Therapie-refraktären Infektionen auf der Spur

Susanne Engelmann, Michael Hecker und Christof von Eiff

Nach bisherigem Verständnis ist der Erreger *Staphylococcus aureus* ein sich primär extrazellulär vermehrender Erreger mit hohem pathogenen Potential und verantwortlich für eine große Bandbreite von akuten Infektionen. *S. aureus*-Infektionen können jedoch auch ausgeprägt chronisch-persistierend mit begrenzter Entzündungsreaktion verlaufen. Durch die Beobachtung, dass bestimmte Infektionsverläufe mit der Isolierung phänotypischer Varianten, sogenannter „Small Colony Variants“ (SCVs), assoziiert sind, konnte ein neues Konzept im Verständnis chronisch-persistierender Staphylokokken-Infektionen erarbeitet werden.

Aufgrund ihres atypischen Aussehens, inklusive veränderter biochemischer Reaktionen, werden SCVs im mikrobiologischen Labor oft nicht als solche erkannt und werden deshalb vermutlich in ihrer Bedeutung und Häufigkeit unterschätzt. Da die zur intrazellulären Persistenz befähigten SCVs häufig eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika zeigen und sich der Wirtsimmunabwehr entziehen können, tragen Fehl- und Mißidentifizierung der SCVs zu einem möglichen Therapieversagen bei. Unter bestimmten Umständen revertieren SCVs wieder zum virulenten Wildtyp, wodurch sie experimentellen Untersuchungen schwer zugänglich sind.

Im Rahmen des PathoGenoMik-Netzwerkes untersuchen wir die Ursachen der SCV-Entstehung. Wir nutzen dazu DNA-Chips und

Proteom-Analysen, um einen Einblick in die molekularen Vorgänge zu gewinnen, die charakteristisch für SCVs sind. So konnten wir zeigen, dass eine Mutante im *hemB*-Gen, die alle sichtbaren Eigenschaften eines SCV-Phänotyps zeigt, ein gutes Modell zum Studium der Physiologie der SCVs darstellt (1). Mit Hilfe des Proteomansatzes wurden Unterschiede in der Genexpression zwischen der *hemB*-Mutante und dem isogenen Wildtyp herausgearbeitet. Dabei zeigte sich, dass in der Mutante glykolytische Enzyme sowie Enzyme des Fermentationsstoffwechsels verstärkt synthetisiert werden, während Proteine des Tricarbonsäure-Zyklus kaum nachweisbar waren. Da die Mutante aufgrund des ausgeschalteten *hemB*-Gens keine funktionelle Atmungskette besitzt und weder Sauerstoff noch Nitrat als terminalen Elektronenakzeptor nutzen kann, kann ATP nur über Substratphosphorylierung in der Glykolyse synthetisiert werden, was sich in deutlich niedrigeren ATP-Konzentrationen widerspiegelt. Analysen der Fermentationsprodukte zeigten, dass in der Mutante hauptsächlich Laktat gebildet wird. Trotz der Anwesenheit der Pyruvat-Dehydrogenase und der Pyruvat-Formiat-Lyase waren weder Ethanol noch Acetat in signifikanten Mengen nachweisbar. Weiterhin war in der Mutante eine deutliche Induktion der Arginin-Deiminase und der Ornithin-Carbonyltransferase festzustellen. Diese beiden Enzyme sind am fermentativen Abbau von Argi-

nin beteiligt, der eine weitere Möglichkeit zur ATP-Gewinnung für die Mutante darstellt. Untersuchungen zum extrazellulären Proteom zeigten außerdem, dass eine Vielzahl von Virulenzfaktoren nicht oder kaum gebildet wurden.

Mit der Nutzung der DNA-Chip- und Proteom-Technologie ist es erstmals gelungen, ein umfassendes Bild der veränderten Stoffwechsellage dieser besonderen Lebensform von Staphylokokken aufzuzeigen. Die Identifizierung einzelner Enzyme und Synthesewege ist der erste Schritt, für die Entwicklung neuer Therapieansätze gegen diese Bakterien.

Literatur

1. Kohler et al. (2003) Characterization of a Heme-Deficient Mutant of *Staphylococcus aureus* by a Proteomic Approach. *J. Bacteriol.* 185: 6928-6937.

Kontakt

Prof. Dr. Michael Hecker
Dr. Susanne Engelmann
*Institut für Mikrobiologie
Universität Greifswald*
Susanne.Engelmann@uni-greifswald.de

Prof. Dr. Christof von Eiff
*Institut für Medizinische Mikrobiologie
Universität Münster*
eiffc@uni-muenster.de

Wie werden Bakterien antibiotikaresistent? Pneumokokken als Gendiebe

Regine Hakenbeck

Der Vormarsch antibiotikaresistenter Bakterien, der in den letzten Jahrzehnten dramatisch zugenommen hat, fordert schnelle Testsysteme zum Erfassen der Resistenzmuster, um eine gezielte Therapie möglichst schnell zu erlauben. Bei einer Meningitis sind resistente Keime besonders gefährlich, da sich im Gehirn längst nicht so hohe Konzentrationen der Wirkstoffe erzielen lassen wie in anderen Organen. Pneumokokken, die für ein ganzes Arsenal von Krankheitsbildern verantwortlich sind wie Hirnhautentzündung, Mittelohr- und Lungenentzündung, sind eines der Paradebeispiele für diese Entwicklung: waren 1970 noch alle Isolate weltweit als sensitiv gegen Penicillin eingestuft (dem Antibiotikum, das gerade gegen Pneumokokken besonders gut wirkt), sind die Zahlen derzeit auf 30 bis über 50 % resistente Isolate in europäischen Ländern wie Spanien, Frankreich und Ungarn, und in allen anderen Kontinenten – den USA, Südafrika, Taiwan, Japan – angestiegen. Rätselhaft war diese Entwicklung zunächst schon, da sich der Trend in Laborversuchen so schnell gar nicht nachvollziehen ließ.

Bald gab es Hinweise, dass die genetischen Veränderungen, die für Penicillinresistenz wichtig sind, sich gar nicht durch Mutationen in den Bakterien selber erklären lassen, sondern man vermutete, dass veränderte Gene aus anderen, nahe verwandten Bakterien diejenigen der sensitiven Pneumokokken ersetzt haben. Dieser Prozess ist bei Pneumokokken durchaus möglich, da sie – wie auch andere verwandte Streptokokken, zu denen sie gehören – über eine perfekte Maschinerie verfügen, die es ihnen erlaubt fremde DNA aufzu-

nehmen und in ihr eigenes Chromosom zu integrieren. Unsere Abteilung an der TU Kaiserslautern, beschäftigt sich mit Antibiotikaresistenzen, dem Gentransfer zwischen verschiedenen Bakterien, und der Regulation von bakteriellen Komponenten, die für die Auslösung von Krankheiten von Bedeutung sind. Dafür bietet die Genomforschung jetzt völlig neue Perspektiven.

Inzwischen konnten die Forscher der TU Kaiserslautern im Rahmen des Kompetenznetzwerks PathoGenoMik weitere Beweise für diese Strategie darlegen. Interessanterweise werden von den Krankheitserregern Bakterien als 'Spender' der Gene benützt, die als harmlose Besiedler in jedem Menschen vorkommen und dort auch ständig nachweisbar sind. Eben diese Bakterien sind aber jeglicher Antibiotikatherapie ausgesetzt, die ihr Wirt durchmacht, und stehen somit unter permanent wiederholtem Selektionsdruck. Kein Wunder, dass diese Bakterien, die in den Kliniken keine Beachtung finden und deren Resistenzspektrum auch nie in Routine-tests erfasst werden, ein umfassendes Arsenal potenter Resistenzgene angesammelt haben.

Die gesamte Information eines solchen multipel und hoch Antibiotika-resistenten harmlosen, 'kommensalen' Bakteriums *Streptococcus mitis* wurde in Kooperation mit der Firma AGOWA (Berlin) von den Forschern in Kaiserslautern – der Abteilung Mikrobiologie in enger Kooperation mit dem Nano-Bio-Center der TU Kaiserslautern – im Rahmen des Kompetenznetzwerks PathoGenoMik analysiert. Die Anzahl von Resistenzgenen, die in dem Genom des harmlosen *Streptococcus* von ihnen gefunden wurde, zeigt neuartige raffinierte Strategi-

en, möglichst viele solcher Resistenzgene als kompaktes Paket zu versammeln und auch möglichst effizient in andere Bakterien einschleusen zu können, zeigen aber auch gleichzeitig das breite Arsenal an Abwehrmechanismen, die den Pneumokokken zur Verfügung stehen. Die Herkunft der Gene in dem Genom des *S. mitis* Stammes läßt auf ein ungeahnt breites Spektrum von Bakterien schließen, deren Gene sich die Streptokokken einverleiben können,

Der Vergleich der Genominformation eines Krankheitserregers mit dem eines harmlosen engen Verwandten eröffnet ganz neue Perspektiven. So können 'eigene' und 'fremde' Gene in einer Bakterienart differenziert werden, Ergebnisse, die dazu beitragen spezifische Sonden zu entwickeln, mit denen eindeutig Sonden zu entwickeln, mit denen eindeutig sowohl die Bakterienart als auch deren Antibiotikaresistenzen innerhalb kurzer Zeit getestet werden können. Außerdem kann die Genominformation für epidemiologische Untersuchungen ausgenutzt werden, die helfen Ausbreitung und Resistenzentwicklung in Krankheitserregern verfolgen zu können. Die Forscher versprechen sich auch über die Identifikation der Gene, die für die Virulenz von Pneumokokken verantwortlich sind, also in den harmlosen Keimen nicht vorkommen, die Entwicklung neuer Strategien zur Bekämpfung des Krankheitserregers.

Kontakt

Prof. Dr. Regine Hakenbeck
Abteilung für Mikrobiologie
Technische Universität Kaiserslautern
E-mail: hakenb@rhrk.uni-kl.de

Vergleichende Genomanalyse des Genus *Listeria*

Michael Kuhn und Torsten Hain

Das Genus *Listeria* umfasst sechs Arten, von denen zwei krankheitserregend (pathogen) sind. Von den in der Natur weit verbreiteten Listerien infiziert *Listeria ivanovii* vorwiegend Tiere wie Rinder und Schafe; *Listeria monocytogenes* kann auch den Menschen befallen und ist hier für relativ seltene, aber häufig tödlich verlaufende Erkrankungen verantwortlich. Mit den Bakterien kontaminierte Lebens- oder Futtermittel lösen immer wieder kleinere Listeriose-Epidemien aus. Das Krankheitsbild reicht dabei von milden Magen-Darbeschwerden bis hin zu Entzündungen des Gehirns und der Hirnhäute, die vor allem bei Neugeborenen und immungeschwächten Patienten oft tödlich verlaufen. Meist wird die Verunreinigung von Lebensmitteln mit Listerien rechtzeitig, das heißt vor Auslieferung an den Verbraucher, erkannt; die dann notwendigen Rückrufaktionen führen jedoch zu erheblichen wirtschaftlichen Verlusten. Außer den genannten Krankheitserregern umfasst das Genus *Listeria* noch die Arten *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* und *L. grayi*, alles harmlose (apathogene) Umweltkeime.

Um zu verstehen, welche Eigenschaften die Listerien zu gefährlichen Lebensmittel- oder harmlosen Umweltkeimen machen, hat ein Team aus Forschergruppen aus Gießen, Würzburg und Braunschweig zusammen mit dem Institut Pasteur in Paris und einigen weiteren europäischen Gruppen bereits die gesamten Erbinformationen von *L. monocytogenes* und der nahe verwandten, aber harmlosen Art *L. innocua* entschlüsselt und veröffentlicht (1, 2). Im Rahmen des Kompetenznetzes PathoGenoMik werden nun von den Gruppen in Gießen, Würzburg, Braunschweig und Paris die Genome von fünf weiteren Vertretern der Gattung *Listeria* komplett sequenziert. Die Sequenzierungen von *L. ivanovii*, *L. welshimeri* und *L. seeligeri* sind bereits abgeschlossen, die Auswertung der Daten hat begonnen und die Publikation der Sequenzen wird gegenwärtig vorbereitet. Die Sequenzierung von *L. grayi* – an letzterer ist auch das Kompetenznetz mit Zentrum in Göttingen beteiligt – und eines weiteren *L. mono-*

cytogenes Stammes des Serovars 4a befindet sich in der Endphase.

Nach Abschluss der Arbeiten werden damit erstmals überhaupt die Genomsequenzen aller Mitglieder einer Bakteriengattung bei Gram-positiven Bakterien bekannt sein. Zusätzlich wird neben den Vergleich der einzelnen Listerienarten untereinander auch eine Analyse der drei Hauptgruppen der Spezies *L. monocytogenes* vertreten durch die Serovare 1/2a, 4a und 4b durchgeführt, um art- wie auch stammspezifische Markergene des humanpathogenen Erregers zu identifizieren.

Die umfassende Auswertung der Genomdaten wird die weitere Erforschung der Pathogenitätsmechanismen von *L. monocytogenes* – und besonders das Verständnis deren stammesgeschichtlicher Entwicklung – einen großen Schritt nach vorne bringen und schließlich auch eine bessere Kontrolle dieses relativ seltenen, aber sehr gefährlichen Bakteriums erlauben.

In der laufenden zweiten Förderperiode von PathoGenoMik sollen nun die erzielten Forschungsergebnisse dazu benutzt werden, neue Identifizierungsverfahren durch Verwendung von diagnostischen DNA-Chips zu entwickeln,

die sowohl eine schnelle und sichere Unterscheidung zwischen harmlosen und pathogenen Listerienarten erlauben und zusätzlich dazu eingesetzt werden, um neue Targets für Medikamente zu finden, die eine schnelle Bekämpfung von Infektionen mit *L. monocytogenes* ermöglichen.

Literatur

1. Glaser et al. (2001) Comparative genomics of *Listeria* species. *Science* 294:849-852.
2. <http://genolist.pasteur.fr/ListiList/index.html>
3. Ghai et al. (2004) GenomeViz: visualizing microbial genomes. *BMC Bioinformatics* 5:198.

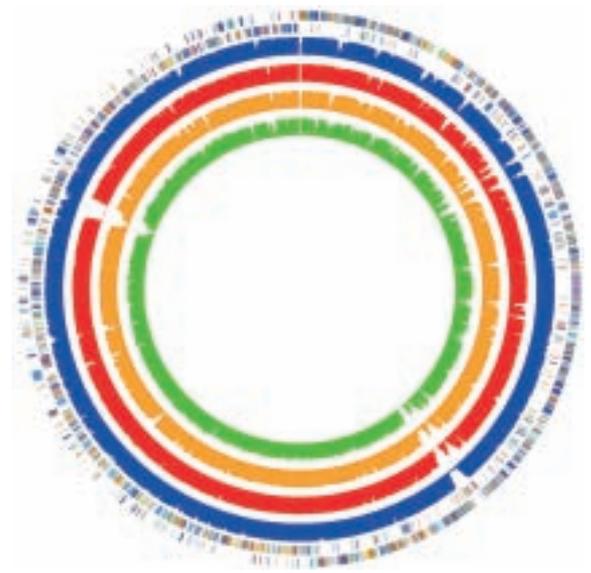
Kontakt

PD Dr. Michael Kuhn
Kompetenzzentrum PathoGenoMik
Universität Würzburg
E-mail: kuhn@biozentrum.uni-wuerzburg.de

Dr. Torsten Hain

Institut für Medizinische Mikrobiologie
Universität Gießen
E-mail:
torsten.hain@mikro.bio.med.uni-giessen.de

Abb: Gesamtgenom-Alignments des Erbguts von fünf *Listeria*-Arten. Von außen nach innen betrachtet: *L. monocytogenes* EGDe Serovariante 1/2a COG Kategorien (beide äußere Ringe), *L. monocytogenes* F6854 Serovariante 1/2a (blau, 133 Contigs), *L. monocytogenes* F2365 Serovariante 4b (rot, Gesamtgenom), *L. monocytogenes* H7858 Serovariante 4b (orange, 180 Contigs) und *L. innocua* (grün, Gesamtgenom). Alle Genome wurden einzeln in Bezug auf *L. monocytogenes* EGDe mit dem Software-Paket AVID angeordnet (3). Die Sequenzdaten der Stämme *L. monocytogenes* F6854 und H7858 wurden vom Institute for Genomic Research erhalten.



Entdeckung neuer Impf- und Diagnostika-Antigene bei der Tuberkulose

Stefan H. E. Kaufmann und Helmy Rachman

Forscher aus der Abteilung Immunologie des Max-Planck-Instituts für Infektionsbiologie in Berlin konnten neue Erkenntnisse zur Aufklärung der Lungentuberkulose auf molekularer Ebene gewinnen. Gegenwärtig erfolgt die Verwertung der Ergebnisse zur Identifikation neuer Impf- und Diagnostika-Antigene sowie neuer, chemotherapeutisch wirksamer Stoffklassen und Substanzen.

Die Entschlüsselung der Erbinformation von *Mycobacterium tuberculosis*, dem Erreger der Tuberkulose, im Jahr 1998 ermöglichte die chemische Synthese von kurzen Abschnitten der durch Computeranalyse vorhergesagten Gene. Durch die Verwendung genspezifischer Primer-Paare und der isolierten Erbsubstanz – der chromosomalen DNA – aus *M. tuberculosis* H37Rv wurden über 99% der vorhergesagten offenen Leseraster mittels Polymerase-Kettenreaktion als ca. 300 Basenpaar lange Genabschnitte synthetisiert und anschließend damit DNA-Arrays hergestellt. Mit den Arrays wurden Genomvergleiche zwischen *M. tuberculosis* und anderen Mykobakterienarten unterschiedlicher Pathogenität durchgeführt. So konnten Gene identifiziert werden, die nur im Tuberkulose-Erreger vorkommen und in allen anderen untersuchten Mykobakterienarten fehlen. Diese Gene kodieren wahrscheinlich nicht nur wichtige Pathogenitätsfaktoren, sondern auch potenzielle Impf- und ganz besonders Diagnostik-Antigene.

Außerdem wurden ausführliche Transkriptom-Analysen des Tuberkulose-Erregers durchgeführt. Hierzu wurde Lungenmaterial von Tuberkulosepatienten verwendet, die an multiresistenter Tuberkulose leiden und daher einer chirurgischen Lungenresektion unterzogen werden mussten. Auf diese Weise konnten diejenigen Gene von *M. tuberculosis* identifiziert werden, die während der Lungentuberkulose differenziell reguliert werden. Zahlreiche dieser Gene mit bislang unbekannter Funktion wurden mit Hilfe computergestützter bioinformatischer Analysen in Proteinnetzwerke einge-

ordnet. Dies erlaubt Rückschlüsse auf die wahrscheinliche Funktion der Gene im Infektionsprozess. Diese Untersuchungen ermöglichten die Erstellung von Signaturen des Tuberkulose-Erregers während der Infektion und bilden daher die Grundlage für die Identifizierung neuer Impfantigene und von Zielstrukturen für neue Chemotherapeutika.

Weiter wurde am Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie in Kooperation mit Combinate Biopharm AG der Einfluss chemotherapeutischer Substanzen auf die Expression mykobakterieller Gene zur Identifizierung potenzieller Zielstrukturen und neuer chemotherapeutisch wirksamer Stoffklassen untersucht. Hierzu wurde ein Verfahren etabliert, mit welchem Substanzen aus vermutlich Antibiotika produ-

zierenden Actinomyceten-Stämmen parallel auf antibakterielle Aktivität analysiert werden konnten. Mit Hilfe dieses Untersuchungsverfahrens konnte aus der Vielzahl von ca. 1000 Testsubstanzen eine Gruppe von etwa 40 Kandidaten-Substanzen eingengt werden. Diese Substanzen werden nun mittels der Transkriptom-Analyse mit den zurzeit in der Tuberkulose-Therapie verwendeten Antibiotika verglichen, um die molekularen Wirkmechanismen aufzuklären.

Kontakt

Prof. Dr. Stefan H.E. Kaufmann
 Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie
 Berlin
 E-mail: kaufmann@mpiib-berlin.mpg.de

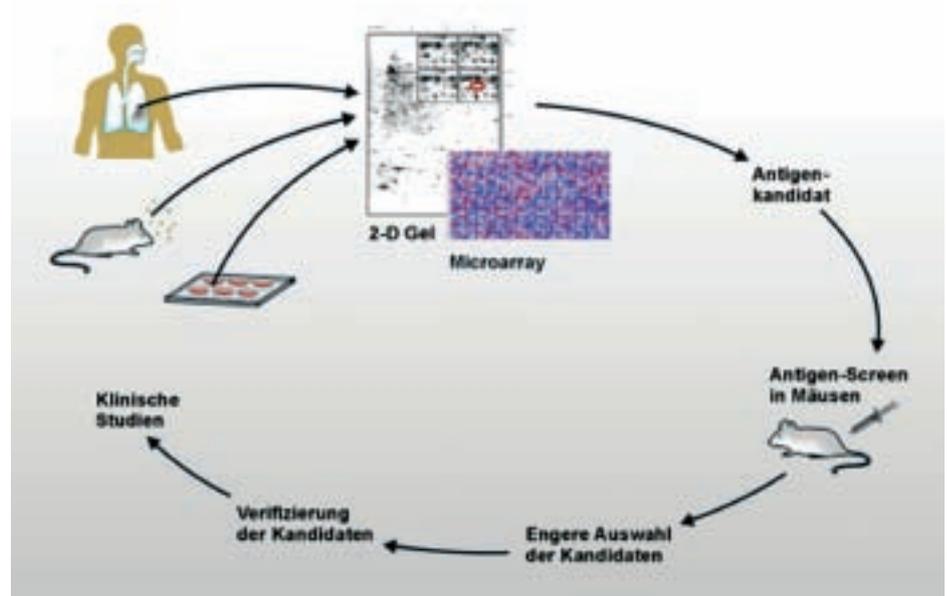


Abb: Strategische Vorgehensweise bei der Entdeckung neuer Impf- und Diagnostika-Antigene bei der Tuberkulose. Aufbauend auf Transkriptom- und Proteom-Untersuchungen werden differenziell exprimierte Proteine des Tuberkulose-Erregers identifiziert und dann in einem sequenziellen Durchsatzverfahren ihr Wert als Impf- und Diagnostika-Antigene ermittelt.

Entschlüsselung des Genoms des krebserregenden Bakteriums *Helicobacter hepaticus*

Sebastian Suerbaum

Helicobacter pylori ist der zweithäufigste Krankheitserreger des Menschen. Die Infektion mit diesem Bakterium erhöht das Risiko, an Magenkrebs oder bösartigen Magenlymphomen zu erkranken und *H. pylori* ist daher seit 1994 als Krebserreger eingestuft. Aber *H. pylori* ist nicht das einzige Bakterium, das Krebserkrankungen hervorrufen kann. *Helicobacter hepaticus* ist ein mit *H. pylori* eng verwandtes Bakterium, das bei Mäusen Leberentzündungen (Hepatitis), Leberkrebs und entzündliche Darmerkrankungen hervorruft. Gemeinsam mit Wissenschaftlern vom Massachusetts Institute of Technology, USA, der deutschen Firma MWG

GeneData nicht realisierbar gewesen. Die Zusammenarbeit hat unsere langjährige Expertise auf dem Gebiet der pathogenen Helicobacterarten mit der industriellen Kompetenz von MWG Biotech und GeneData auf den Gebieten der Hochdurchsatzsequenzierung und Bioinformatik zusammengebracht und war dadurch außerordentlich fruchtbar. Es bleibt zu hoffen, dass solche Zusammenarbeiten in der Zukunft Schule machen, weil sie für alle Beteiligten – universitäre Partner und Industrieunternehmen – von großem Vorteil sein können.

Literatur

1. Suerbaum et al. (2003) The complete genome sequence of the carcinogenic bacterium *Helicobacter hepaticus*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:7901-7906.

Kontakt

Prof. Dr. Sebastian Suerbaum
 Institut für Medizinische Mikrobiologie
 und Krankenhaushygiene
 Medizinische Hochschule Hannover
 E-mail: suerbaum.sebastian@mh-hannover.de

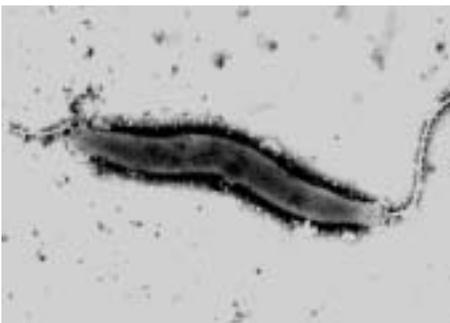


Abb. 1: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme von *Helicobacter hepaticus* (copyright: C. Josenhans)

Biotech AG und der Schweizer Bioinformatikfirma GeneData® hat meine Arbeitsgruppe die komplette Genomsequenz dieses Bakteriums entschlüsselt (1).

Da jetzt sowohl das Genom des bakteriellen Krankheitserregers als auch das des Wirtsorganismus (Maus) vollständig bekannt sind, eröffnet die Genomsequenz von *H. hepaticus* die Möglichkeit, die Ursachen der karzinogenen Potenz dieses Bakteriums im Mausmodell systematisch zu untersuchen. Von besonderem Interesse sind hierbei zum einen Gemeinsamkeiten mit *H. pylori* und außerdem eine neue Gruppierung von Virulenzgenen, eine sogenannte „Pathogenitätsinsel“, die die Forscher im Genom von *H. hepaticus* entdeckten.

Dieses Projekt wäre ohne das erhebliche Engagement der Firmen MWG Biotech und

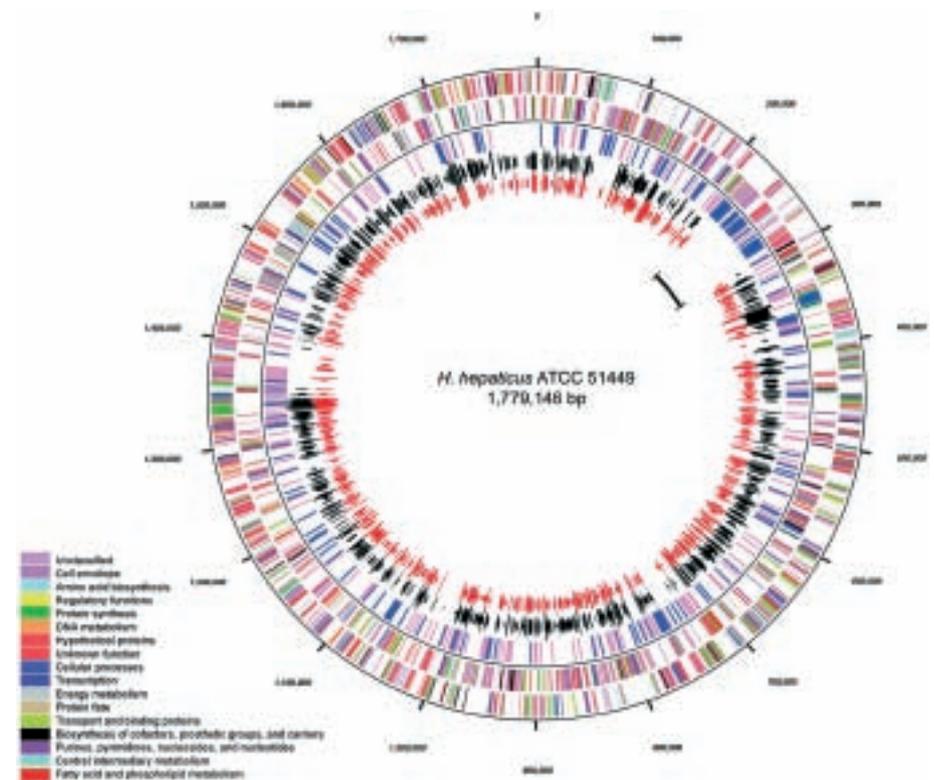


Abb. 2: Zirkuläre Darstellung des *H. hepaticus* Genoms und seine Beziehung mit den Genomen von *H. pylori* und *Campylobacter jejuni*. Von außen nach innen repräsentieren die ersten beiden Ringe die Positionen der codierenden Sequenzen die mit oder gegen den Uhrzeigersinn transkribiert werden. Die Farben repräsentieren die funktionalen Kategorien der codierten Proteine. Der dritte Ring stellt Regionen des Chromosoms dar, die einen mehr als 5% höheren (pink) oder niedrigeren (blau) G+C Gehalt aufweisen. Der vierte und der fünfte Ring repräsentieren Genes mit Orthologen in *H. pylori* (schwarz) und *C. jejuni* (rot). Die Länge der Linien welche die Orthologen darstellen ist proportional zur Sequenzähnlichkeit. Die Position der HHG11 genomischen Insel ist auf dem innersten Ring vermerkt. (aus Suerbaum et al., 2003).

Spuren der Menschheitsgeschichte in den Genen eines Krankheitserregers

Sebastian Suerbaum und Mark Achtman

Das im Magen des Menschen lebende pathogene Bakterium *Helicobacter pylori* offenbart, auf welchen Wegen unsere Vorfahren die Welt besiedelt haben (1).

Helicobacter pylori besiedelt die Magenschleimhaut von mehr als der Hälfte der Weltbevölkerung. Dies kann oft über Jahrzehnte andauern und zu Magen- und Zwölffingerdarm-Geschwüren führen, wenn keine Behandlung erfolgt. Durch die Infektion erhöht sich außerdem das Risiko, an bösartigen Magentumoren zu erkranken, *H. pylori* ist als Krebserreger (Karzinogen) anerkannt. Das Bakterium wird vorwiegend innerhalb von Familien übertragen und verbreitet sich nicht epidemisch. Es zeichnet sich durch eine sehr starke genetische Diversität aus, die etwa fünfzig Mal höher ist als beim Menschen. Seine DNA-Sequenzen sind in Abhängigkeit von der geographischen Region, in der die Bakterien isoliert wurden, sehr unterschiedlich.

Zusammen mit unseren Kooperationspartnern von sechs weiteren Universitäten in den USA und Frankreich konnten wir zeigen, dass *Helicobacter* den Menschen bereits seit Urzeiten bei seinen Wanderungen begleitet. Wir untersuchten den Krankheitserreger in 27 Menschengruppen unterschiedlicher ethnischer Zugehörigkeit und geographischer Herkunft und klärten seine weltweite Populationsstruktur mit genetischen Methoden auf.

Die detaillierte Analyse des Erbguts

ergab, dass sich die Bakterien sieben Gruppen und Untergruppen zuordnen lassen. Dann entwickelten wir eine neue mathematische Methode, um die Vorfahren zu rekonstruieren und kamen auf vier *Helicobacter*-Populationen, die ihren Ursprung in Afrika und dem Nahen Osten sowie in Zentral- und Ostasien hatten. Durch den Vergleich zwischen diesen und den heutigen Populationen lässt sich nun rekonstruieren, wie das Magenbakterium sich zusammen mit dem Menschen auf der Erde verbreitet hat.

Jeder heutige *Helicobacter* Typ trägt die Spuren seiner Vorfahren. Denn treffen im Magen verschiedene *Helicobacter*-Stämme aufeinander, dann können sie untereinander Erbinformationen austauschen. So sind die heute in Europa nachweisbaren Bakterien das Ergebnis einer genetischen Verschmelzung zweier Populationen, die unabhängig voneinander aus Zentralasien und dem Nahen Osten nach Europa eingewandert sind. Andere Populationen entwickelten sich während der mehrere tausend Jahre langen Isolation der Polynesier im Pazifik, der Wanderung der sibirischen Vorfahren der Indianer über die Beringstraße nach Amerika oder der Expansion der Bantu in Afrika.

In vielen Gegenden der Erde herrscht heute durch die Vermischung der Bevölkerungsgruppen eine heftige Konkurrenz zwischen den ursprünglich ansässigen Bakterien und solchen, die in den vergangenen Jahrhunderten einwanderten. Zu Stande kam diese

Situation beispielsweise durch die von Europa ausgegangene Kolonialisierung von Nord- und Südamerika oder durch den Sklavenhandel.

Unsere Forschungsergebnisse haben möglicherweise auch wichtige Auswirkungen auf die Behandlung von Infektionen mit *Helicobacter*. Der Grund: Genetische Unterschiede können eine unterschiedliche Aggressivität der Erreger zur Folge haben. Sie können auch die Effizienz von Antibiotika beeinflussen. Außerdem müssen diese Unterschiede bei der Entwicklung eines Impfstoffs in Betracht gezogen werden, wenn dieser Schutz gegen *Helicobacter*-Stämme aus allen Regionen der Welt verleihen soll.

Literatur

1. Falush et al. (2003) *Traces of human migrations in Helicobacter pylori populations.* *Science* 299:1582-1585.

Kontakt

Prof. Dr. Sebastian Suerbaum
Institut für Medizinische Mikrobiologie
und Krankenhaushygiene
Medizinische Hochschule Hannover
E-mail: suerbaum.sebastian@mh-hannover.de

PD Dr. Mark Achtman
Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie
Berlin
E-mail: achtman@mpiib-berlin.mpg.de

Neisseria meningitidis: harmloser Kommensale und gefährliches Pathogen

Matthias Frosch

Meningokokken (*Neisseria meningitidis*) kommen ausschließlich beim Menschen vor. Sie können als Kommensalen die Schleimhaut des Nasen-Rachen-Raumes für Tage bis Monate besiedeln ohne eine Erkrankung auszulösen. Die Keimträgerraten schwanken altersabhängig und können mehr als 30% betragen. Die eigentliche Erkrankung beginnt erst, wenn die Meningokokken die Schleimhautbarriere überwunden haben und sich über die Blutbahn ausbreiten. Invasive Meningokokken-Erkrankungen treten in Form von Hirnhautentzündungen, Blutvergiftungen oder Mischformen auf und sind wegen der schweren Verläufe, der nicht seltenen Todesfälle (10%) und der Spätschäden von erheblicher Bedeutung. Besonders gefährdet sind Säuglinge, Kleinkinder und Jugendliche. Mittels molekularer Feintypisierungsmethoden ist es möglich, die genetische Verwandtschaft von Meningokokkenisolaten zu bestimmen und diese in sogenannte klonale Gruppierungen einzuteilen. Klonale Gruppierungen, die bei Erkrankten gefunden werden, sind äußerst selten bei gesunden Keimträgern zu finden.

Ziel der Meningokokken-Arbeitsgruppe im Kompetenznetzwerks PathoGenoMik ist es daher, durch vergleichende und funktionelle Genomanalysen infektiologisch relevante Genfunktionen bei Meningokokken zu identifizieren.

Im ersten Schritt wurden hierfür in Kooperation mit der Firma MWG Biotech

(Ebersberg) Genomsequenzen ausgewählter apathogener Meningokokkenisolate erstellt. Es handelte sich um einen konstitutiv unbekapselten Stamm ohne Kapselsynthesegene (*cnfI*) des Sequenztyps (ST) 53 (1, 2) sowie um einen bekapselten Stamm der Serogruppe B (ST-136). Stämme dieser Sequenztypen wurden bisher nahezu ausschließlich von Trägern isoliert (3). Für den ST-53 Stamm wurde nach dem Ringchluss der Sequenz eine Annotation mit Hilfe des Programmes GenDB in Kooperation mit dem Zentrum für Biotechnology (CeBiTec) der Universität Bielefeld durchgeführt. Basierend auf dieser Annotation wurde in Kooperation mit der Firma Operon (Köln) ein auf 70mer-Oligonukleotiden basierender Meningokokken-Microarray konzipiert und produziert, der Oligonukleotide für die publizierten pathogenen Meningokokkengenome und den apathogenen ST-53 Stamm umfasst. Dieser Array ist kommerziell erhältlich und wird derzeit von uns für vergleichende Genomhybridisierungen eingesetzt, die Meningokokkenstämme aus mehreren klonalen Komplexen umfassen.

Der Vergleich der ST-53 Sequenz mit den bereits publizierten Genomsequenzen pathogener Meningokokkenisolate zeigte, dass das Genom des apathogenen ST-53 Stammes mit 2146 kb deutlich kleiner ist und dass im Vergleich zu den publizierten Sequenzen mehrere Gene fehlen. Hierzu zählen Gene, die zu gravierenden Veränderungen der äußeren

Struktur der Bakterien führen, und auch Gene, die für die Adhäsion der Meningokokken an humane Zellen unerlässlich sind. Es ist anzunehmen, dass das Zusammenspiel dieser und ggf. weiterer Faktoren von Bedeutung für die Attenuierung apathogener Meningokokken ist.

Die Ergebnisse der Sequenzvergleiche werden zu neuen Erkenntnissen über die Pathogenität der Meningokokken führen. Die Sequenzinformationen können die Basis für neue diagnostische Ansatzpunkte, aber auch für die Entwicklung neuer Impfstoffe sein. Solche Impfstoffe werden dringend benötigt, da eine umfassende Impfung gegen alle Meningokokken zurzeit noch nicht möglich ist. Eine Publikation der Genomsequenz ist in Vorbereitung.

Literatur

1. Claus et al. (2002) Many carried meningococci lack the genes required for capsule synthesis and transport. *Microbiology* 148:1813-1819.
2. Claus et al. (2005) Genetic analysis of meningococci carried by children and young adults. *J. Infect. Dis.* 191:1263-1271.
3. <http://pubmlst.org/neisserial>

Kontakt

Prof. Dr. Matthias Frosch
Institut für Hygiene und Mikrobiologie
Universität Würzburg
E-mail: mfrosch@hygiene.uni-wuerzburg.de

Umweltkeime – ein genetisches Reservoir für Virulenzfaktoren von Krankheitserregern?

Roy Gross

Einer der wichtigsten Fortschritte der Menschheit in der Neuzeit lag sicherlich in der Erkenntnis, dass einfache hygienische Maßnahmen, wie zum Beispiel die Bereitstellung von sauberem Trinkwasser, den Gesundheitszustand der Bevölkerung drastisch verbessern konnten. Tatsächlich führte eine verbesserte Hygiene bereits vor der Einführung von Antibiotika zu einem deutlichen Rückgang von durch infektiöse Keime verursachter Morbidität bzw. Mortalität. Allerdings führte dies in weiten Teilen der Bevölkerung auch zur falschen Ansicht, dass Bakterien generell gefährlich seien und deswegen immer und überall bekämpft werden müssten.

Heute wissen wir, dass nur ein verschwindend kleiner Teil aller Mikroben für uns Menschen gefährlich werden kann, während die meisten Mikroorganismen für uns harmlos oder sogar nützlich sind. Andererseits sind viele Krankheitserreger wie zum Beispiel der vor allem für Kleinkinder so gefährliche Erreger des Keuchhustens *Bordetella pertussis* eng mit harmlosen Umweltkeimen wie dem kürzlich von uns erstmals beschriebenen Bakterium *Bordetella petrii* (1) verwandt. Diese enge Verwandtschaft von Krankheitserregern und harmlosen Umweltbak-

terien bietet uns durch den sorgfältigen Vergleich der Eigenschaften dieser Bakterien die Möglichkeit zu erforschen, warum der eine Mikroorganismus gefährlich ist, der andere aber nicht.

In unserem Projekt im Rahmen des Kompetenznetzwerks PathoGenoMik haben wir deshalb die vollständige genetische Information des Umweltkeims *B. petrii* entziffert, um sie mit der kürzlich entschlüsselten Genominformation von *B. pertussis* und anderen pathogenen *Bordetella* Arten zu vergleichen. Erste Ergebnisse unserer Untersuchungen ergaben überraschenderweise, dass auch der Umweltkeim *B. petrii* über eine ganze Reihe wichtiger Eigenschaften des gefährlichen Keims verfügt. So kann er Faktoren produzieren, die essentiellen Virulenzfaktoren des Keuchhustenerregers sehr ähneln, wie z.B. das sog. Filamentöse Hämagglutinin, die Fimbrien, das Tracheale Zytotoxin und das virulenzregulatorische BvgAS Signaltransduktionssystem. Zudem finden sich weitere Gene mit Ähnlichkeiten zu Virulenzfaktoren anderer Pathogene, deren Funktion noch nicht bekannt ist.

Das bedeutet, dass Umweltkeime ein genetisches Reservoir für wichtige Virulenzfak-

toren darstellen können, und dass sie bereits zur Evolution von Krankheitserregern wie z.B. *B. pertussis* beigetragen haben oder künftig an der Entstehung neuartiger Krankheitserreger Anteil haben könnten. Die Charakterisierung von eng mit Krankheitserregern verwandten apathogenen Keimen bzw. Umweltbakterien stellt deshalb ein wichtiges neues Arbeitsgebiet dar, das unser Verständnis von bakterieller Pathogenität erheblich erweitern, wichtige Beiträge zur Risikoabschätzung von bislang noch wenig charakterisierten Bakterien leisten und zur Entwicklung von neuen diagnostischen, präventiven und therapeutischen Ansätzen führen wird.

Literatur

1. von Wintzingerode et al. (2001). *Bordetella petrii* sp. nov., isolated from an anaerobic bioreactor, and emended description of the genus *Bordetella*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51:1257-1265.

Kontakt

Prof. Dr. Roy Gross
Lehrstuhl für Mikrobiologie
Universität Würzburg
E-mail: roy@biozentrum.uni-wuerzburg.de

Neue Diagnostikverfahren zur Erkennung gefährlicher Colibakterien

Sören Schubert

Das Darmbakterium *Escherichia coli* gehört zur normalen Darmflora des Menschen. Dennoch werden eine Vielzahl bedrohlicher Infektionskrankheiten, wie Harnwegsinfekte, Hirnhautentzündungen und Blutvergiftungen, aber auch schwere Durchfallerkrankungen bei Kindern von Colibakterien verursacht. Nach Schätzung der Weltgesundheitsorganisation (WHO) werden jährlich weltweit ca. 200 Mio. Erkrankungen von *E. coli* verursacht.

Während der letzten Dekade hat die molekularbiologische Analyse von *E. coli* aus Patientenproben deutlich gemacht, dass die „*E. coli*-Familie“ sich aus einer großen „Mannschaft von Spezialisten“ zusammensetzt, die nicht nur Menschen sondern ganz unterschiedliche Wirte infizieren und unterschiedliche Krankheiten verursachen können. Diese „Spezialisten“ können anhand des charakteristischen Profils ihrer krankheitsverursachenden Faktoren (Pathogenitäts-faktoren), bzw. des zugehörigen Gen-Repertoires verschiedenen Pathotypen zugeordnet werden. Bislang kennt man von diesen Gen-Repertoire nur die Spitze des Eisbergs (1). So ist eine Unterscheidung von harmlosen und gefährlichen *E. coli* Bakterien und eine Differenzierung nach Pathotypen durch konventionelle Methoden bisher nicht möglich gewesen.

In diesem von BMBF geförderten Forschungsverbund werden durch Einsatz moder-

ner molekularer Methoden (DNA-Arrays) erstmals die verschiedenen genetischen Ausstattungen, die für die unterschiedlichen Erkrankungen verantwortlich sind, umfangreich erfasst und zudem neue Pathogenitätsgene charakterisiert.

Die Arbeiten zeigen, dass den harmlosen und pathogenen *E. coli* eine genetische Basisausstattung gemeinsam ist. Etwa ein Drittel des genomischen Bauplans ist aber variabel und genau dort liegt die Grundlage der pathogenen Eigenschaften von *E. coli* (2). Die Analyse dieser genetischen Zusatzausstattung zeigte den interessanten Aspekt, dass ein Instrument zur Schädigung der Wirtszellen - der molekulare Injektionsapparat „Typ III-Sekretionssystem“ – gleichartig bei vielen Pathotypen vorhanden ist, dass jedoch diese molekulare „Spritze“ bei den verschiedenen Pathotypen mit unterschiedlichen Effektorproteinen „geladen“ wird (3, 4). Offensichtlich bestimmen die Eigenschaften dieser „injizierten“ Effektorproteine das Krankheitsbild.

Die Kenntnis dieser molekularen Grundlagen ermöglicht die Entwicklung eines schnellen, hochspezifischen und differenzierten Diagnostikverfahrens auf der Basis neuartiger molekularer DNA-Chips, die eine umfassende Risikobewertung von *E. coli* Isolaten erlauben. Auf diese Art können *E. coli* Isolate aus so verschiedenen Bereichen wie Umwelt, Nahrung

und Gesundheit charakterisiert werden, um „Nützlinge“ von „Ganoven“ zu unterscheiden. Zusätzlich können so erstmals vorausschauende Untersuchungen von Proben bei Risikopatienten durchgeführt werden, um mögliche Infektionsrisiken bereits im Vorfeld zu erkennen und ausschalten zu können.

Literatur

1. Dobrindt et al. (2003) Analysis of genome plasticity in pathogenic and commensal *Escherichia coli* isolates by use of DNA arrays. *J. Bacteriol.* 185:1831-1840.
2. Sorsa et al. (2004). Identification of novel virulence-associated loci in uropathogenic *Escherichia coli* by suppression subtractive hybridization. *FEMS Microbiol. Lett.* 230:203-208.
3. Gärtner and Schmidt. (2004) Comparative analysis of locus of enterocyte effacement pathogenicity islands of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 72:6722-6728.
4. Herold et al. (2004) Shiga toxin-encoding bacteriophages--genomes in motion. *Int. J. Med. Microbiol.* 294:115-121.

Kontakt

Dr. S. Schubert

Max-von-Pettenkofer-Institut
für Hygiene und Mikrobiologie
Universität München

E-mail: schubert@pk-i.med.uni-muenchen.de

Die Projektgruppe 7 des PathoGenoMik Netzwerks:

Die Arbeitsgruppen von S. Schubert (München) und U. Dobrindt (Würzburg) setzen sich mit den *E. coli* Erregern von Blutvergiftung (Sepsis) und Harnwegsinfektionen auseinander während in Münster Durchfall-*E. coli* in den Arbeitsgruppen von H. Karch (enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC)) und M. A. Schmidt (enteropathogene *E. coli*: persistierende Durchfälle) untersucht werden.

Funktionelle Genomik und Dynamik pathogener *Escherichia coli*: Variabilität und Migration von krankheitsverursachenden Faktoren

M. Alexander Schmidt und Helge Karch

Die meisten Menschen kennen *Escherichia coli* als harmlosen Vertreter der normalen Darmflora. Leider wird häufig übersehen, das Angehörige der Art *E. coli* für eine Vielzahl lebensbedrohlicher Infektionskrankheiten verantwortlich sein können, wie z.B. Hirnhautentzündungen (Meningitiden), Sepsis, Harnwegsinfekte, aber auch schwere Durchfall-erkrankungen, die zum Teil auch mit akutem Nierenversagen einhergehen können. Molekularbiologische Analysen haben es in den letzten Jahren ermöglicht, den 'Werkzeugkasten' der Erreger, der zur Entwicklung der speziellen Krankheitsbilder beiträgt, mit einiger Genauigkeit zu beschreiben.

Durch die Verwendung moderner molekularer Methoden konnten Wissenschaftler des Kompetenznetzwerks PathoGenoMik erstmals auch die Dynamik der jeweiligen genetischen Ausstattungen erfasst, die für die verschiedenen Krankheitsbilder verantwortlich zeichnen.

Enterohämorrhagische *E. coli* können eine hämorrhagische Kolitis und das sich extraintestinal manifestierende hämolytisch – urämische Syndrom (HUS) hervorrufen. Das HUS, ist die häufigste Ursache des akuten Nierenversagens im Kindesalter. Eine kausale Therapie der durch EHEC verursachten Krankheitsbilder gibt es bisher nicht und Impfstoffe sind nicht verfügbar. Antibiotika, die während der Durchfallerkrankung verabreicht werden, erhöhen das Risiko, ein HUS zu entwickeln. Wegen der Schwere der Erkrankungen ist die Diagnostik der EHEC/EPEC und die Klärung der Ätiopathogenese, des Erregerreservoirs und der Übertragungswege sowie die Identifizierung weiterer Virulenzfaktoren von sehr großer Be-

deutung. Die bisherigen Arbeiten zeigen, dass eine an beiden intestinalen Krankheitsbildern essentiell beteiligte Pathogenitätsinsel (LEE: 'locus of enterocyte effacement') in Aufbau, Organisation und Abfolge der Gene hoch konserviert ist. Proteine, die zum charakteristischen Sekretions- und Injektionsapparat gehören, zeigen eine weitgehende Übereinstimmung, während sezernierte und injizierte Effektorproteine eher variabel erscheinen (1-3). Die häufig ausgedehnten flankierenden Bereiche der eigentlichen Insel geben gewissermaßen als 'Reisesouvenir' Aufschluß über die zurückliegenden 'Wanderungen' der Pathogenitätsinsel etwa durch andere Erreger und Wirte.

Diese Untersuchungen führten bereits zur Entwicklung eines ersten einfachen und schnellen Verfahrens zur diagnostischen Identifizierung von Durchfall-erregenden *Escherichia coli*. Darüber hinaus wurden zahlreiche neue potentielle Virulenzgene bei EHEC – Stämmen identifiziert und charakterisiert. Hierzu zählen Adhäsine, Varianten der Shiga Toxine, die Pathogenitätsinsel SRL (Shigella Resistance Locus) und ein neues, phagenkodiertes Toxin aus der Familie der „Cytotolethale distending Toxins (4-6). Durch Genomvergleiche im Pathoarray konnte eine Kombination verschiedener EHEC-spezifischer Determinanten identifiziert werden, die eine schnelle und sichere Diagnostik erlauben. Diese Determinanten werden bereits jetzt als molekulare Targets bei der klinisch-mikrobiologischen Untersuchung von EHEC herangezogen. Hierdurch konnten wir innerhalb der EHEC verschiedene Subtypen mit unterschiedlicher Assoziation zum Schweregrad des Krankheitsbildes nachweisen.

Literatur

1. Ide et al. (2003) Differential modulation by Ca²⁺ of type III secretion of diffusely adhering enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 71:1725-1732.
2. Knappstein et al. (2004) a1-Antitrypsin binds to and interferes with functionality of EspB from atypical and typical enteropathogenic *Escherichia coli* strains. *Infect. Immun.* 72:4344-4350.
3. Gärtner and Schmidt. (2004) Comparative analysis of locus of enterocyte effacement pathogenicity islands of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 72:6722-6738.
4. Janka et al. (2003) Cytotolethale distending toxin gene cluster in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H- and O157:H7: Characterization and evolutionary considerations. *Infect. Immun.* 71:3634-3638.
5. Friedrich et al. (2004) Phylogeny, clinical associations, and diagnostic utility of the pilin subunit gene (*sfpA*) of sorbitol-fermenting, enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H-. *J. Clin. Microbiol.* 42:4697-4701.
6. Zhang et al. (2005) Transcriptional analysis of genes encoding Shiga toxin 2 and its variants in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:558-561.

Kontakt

Prof. Dr. M. Alexander Schmidt
ZMBE, Institut für Infektiologie
Universität Münster
E-mail: infekt@uni-muenster.de

Prof. Dr. Helge Karch
Institut für Hygiene
Universität Münster
E-mail: hkarch@uni-muenster.de

Die Projektgruppe 7 des PathoGenoMik Netzwerks:

Die Arbeitsgruppen von S. Schubert (München) und U. Dobrindt (Würzburg) setzen sich mit den *E. coli* Erregern von Blutvergiftung (Sepsis) und Harnwegsinfektionen auseinander während in Münster Durchfall-*E. coli* in den Arbeitsgruppen von H. Karch (enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC)) und M. A. Schmidt (enteropathogene *E. coli*: persistierende Durchfälle) untersucht werden.

Genotypisierung von ESBL verursachenden β -Laktamasen mittels DNA-Chips zur Schnelldiagnose mikrobieller Antibiotikaresistenzen in der Medizin

Till T. Bachmann, Verena Grimm, Milorad Susa, Cornelius Knabbe und Rolf D. Schmid

Neue Genomdaten in Kombination mit der DNA-Chipanalyse ermöglichen völlig neue Ansätze in der mikrobiellen Diagnostik. Während der Nachweis mikrobieller Antibiotikaresistenzen in der klinischen Routine in der Regel über kulturabhängige, mehrere Tage dauernde Verfahren erfolgt, sind molekularbiologische Verfahren schneller und zuverlässiger. Ein Beispiel hierfür sind die diagnostischen Genotypisierungs-Chips der Projektgruppe 8 des Patho-GenoMik Netzwerkes. Diese liefern Testergebnisse in weniger als vier Stunden und benötigen prinzipiell keine Kultivierung oder Isolation der Mikroorganismen. Sie ermöglichen damit eine prospektive Therapie und geben darüber hinaus wertvolle Daten für die Epidemiologie und Kontrolle der Antibiotikaresistenz. Die Resistenz von Enterobakterien gegenüber Cephalosporinen der neusten Generationen (z.B. Cefotaxim) ist eine der folgenschwersten Antibiotikaresistenzen und wird durch bakterielle β -Laktamasen mit einem erweiterten Spektrum

(extended spectrum beta lactamase (ESBL)) verursacht. ESBLs entstehen hauptsächlich durch Punktmutationen in den Genen der β -Laktamasen mit Namen TEM, SHV, CTX-M und OXA. In vielen Kliniken wird gegenwärtig ein Anstieg der ESBL-Nachweise beobachtet. Damit verbunden treten vermehrt therapeutische wie krankenhaushygienische Probleme auf mit der Folge verlängerter Patientenliegezeiten und zusätzlicher Kosten.

Unsere Forschergruppe hat eine ganze Serie neuer DNA-Chips zur Genotypisierung von β -Laktamasen entwickelt und erreicht damit wesentliche Meilensteine in der Kompletierung eines gesamten ESBL-Chips, welcher durch den Industriepartner Eppendorf AG verwertet werden soll. Die DNA-Chips für den ESBL-Nachweis verwenden die so genannten Single Nucleotid Polymorphism (SNP)-spezifische Oligonukleotidsonden, die in einem 30-minütigen allelspezifischen Hybridisierungsansatz eine Aussage über die Sequenz einer fluoreszenzmarkierten Ziel-DNA zulassen. Die Stärke dieser Antibiotikaresistenzbestimmung liegt auch darin, dass in klinischen Proben gleichzeitig sensitive und resistente Bakterien identifiziert und mehrere Resistenzgene parallel nachgewiesen werden können. In Mischungsversuchen wurde gezeigt, dass dies je nach Variante bis zu einem zehn- bis hundertfachen Überschuss möglich ist.

Zur Evaluierung der DNA-Chips wurden klinische Isolate des Robert Bosch-Krankenhauses Stuttgart sowie von Kliniken in Moskau und Zadar (Kroatien) untersucht und die Ergebnisse mit Standardmethoden der Resistenzbestimmung und DNA-Sequenzierung validiert. In allen 79 klinischen Isolaten konnten die vorhandenen TEM und SHV Gene mittels DNA-Chip identifiziert werden. Dabei wurden TEM-

1, -2, -3, -7, -8 und -116 sowie SHV-1, -2, -3, -4, -5, -7 und SHV-8 Gene nachgewiesen. Interessanterweise konnten neben Einzelresistenzen auch SHV-5 oder SHV-12 Varianten in Gegenwart der parentalen SHV-1 nachgewiesen und bestätigt werden.

In unseren laufenden Chip-Entwicklungen greifen wir verstärkt auf die wachsende Menge von Genominformationen zurück und integrieren neben Resistenz- und Spezies-Markern auch Virulenzgene auf diagnostischen Chips. Darüber hinaus wird das zukünftige Ziel die vollständige Integration der einzelnen Arbeitsschritte in ein Komplettsystem sein, das dann einen erfolgreichen Einzug in die Routine der klinischen Mikrobiologie findet.

Literatur

1. Leinberger et al. (2005) Development of a DNA Microarray for the detection and identification of fungal pathogens involved in invasive mycoses. *J. Clin. Microbiol.* (im Druck).
2. Yu et al. (2004) Development and validation of a diagnostic DNA microarray to detect quinolone-resistant *Escherichia coli* among clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.* 42:4083-4091
3. Grimm et al. (2004) Use of DNA microarrays for rapid genotyping of TEM beta-lactamases that confer resistance. *J. Clin. Microbiol.* 42:3766-3774

Kontakt

PD Dr. Till T. Bachmann
 Institut für Technische Biochemie
 Universität Stuttgart
 E-mail: till.bachmann@itb.uni-stuttgart.de

Prof. Dr. Cornelius Knabbe
 Robert-Bosch-Krankenhaus
 Stuttgart
 E-mail: Cornelius.Knabbe@rbk.de

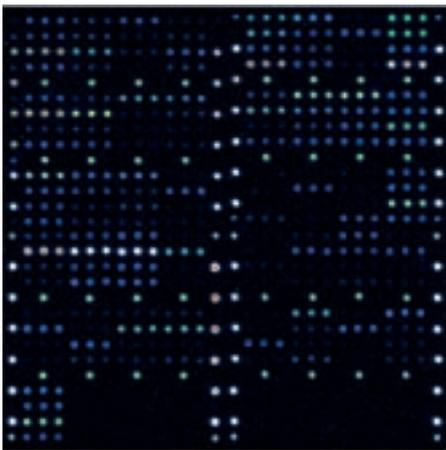


Abb: Beispiel eines TEM-8 Nachweises (ESBL) mit dem TEM-Chip

Derzeit sind DNA-Chips zur Genotypisierung von TEM (~ 650 Spots), SHV (~ 600 Spots) und CTX-M β -Laktamasen (~ 500 Spots) verfügbar und wurden bereits zu einem Gesamtchip inklusive einer Multiplex-PCR integriert. Weitere DNA-Chips für AmpC und OXA vermittelte Resistenzen gegen β -Laktamantibiotika sind derzeit in der Entwicklung.

Oligonukleotidarray für die Diagnostik von Staphylokokken und von Enterokokken

Birgit Strommenger, Guido Werner, Ulrich Nübel und Wolfgang Witte

Beide Erregergruppen, Staphylokokken und Enterokokken, stehen an vorderer Stelle bei Krankenhausinfektionen und haben besondere Bedeutung wegen ihrer Antibiotikaresistenz (methicillinresistente *S. aureus* [MRSA] und glykopeptidresistente Enterokokken [GRE]). Hinzu kommt die zunehmende Verbreitung von com-

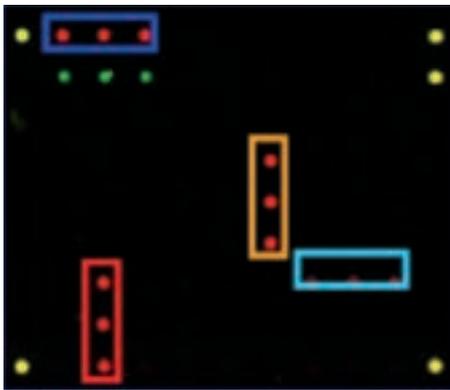


Abb.: Beispiel für das Mikroarray-Modul für die Empfindlichkeitsprüfung von Staphylokokken gegen Antibiotika und dem Ergebnis mit Signalen der Hybridisierung. Positive Signale für *mecA* (Methicillinresistenz), *ermC* (MLS-Resistenz) und die Punktmutation in *gyrA* (Chinolonresistenz).

munity MRSA mit besonderer Invasivität außerhalb von Krankenhäusern. Die schnelle Diagnostik senkt Kosten durch Verkürzung von Krankenhausaufenthalten sowie die Letalität bei schweren Infektionsverläufen.

Auf der Basis der Kenntnis aus der Genom-Sequenzierung wäre theoretisch mittels DNA-Mikroarrays (3000-4000 Oligocapture probes) das Erstellen umfassender Erregerprofile möglich. Hier setzt jedoch die Zielstellung der Entwicklung von Mikroarrays für die klinisch-bakteriologische Diagnostik Grenzen, da bisherige Verfahren der Markierung von Gesamtzell-DNA nicht die dafür erforderliche Sensitivität (Erfassen von 10^3 - 10^4 -Bakterien) erreichen. Dies ist aber möglich durch eine Markierung ausgewählter Resistenz- und Virulenz assoziierter Gene mittels Multiplex-PCR und nachfolgender random-primed PCR mit high-prime labelling.

Die Array-Module für Staphylokokken enthalten verschiedene DNA-Sonden um genau die Gene zu detektieren, die für die Resistenz gegen verschiedene Antibiotika verantwortlich sind. Außerdem wurden solche Sonden hinzugefügt, die in Beziehung zu verschiedenen Krankheiten stehen und auch solche die für

eine eindeutige Bestimmung der Bakterienart notwendig sind.

Bei den Arrays, mit denen die Enterokokken auf Resistenzen geprüft werden sollen, werden neben den für die verschiedenen Antibiotikaresistenzen verantwortlichen Genen, wiederum auch solche aufgenommen, die eine Bestimmung der Bakterienart erlauben und ein weiteres Gen, das Stämme mit einer besonderen Epidemizität charakterisiert.

Literatur

1. Strommenger et al. (2003) Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 41: 4089-4094
2. Werner et al. (2004) Molecular detection of linezolid resistance in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* by use of 5'nuclease real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 42: 4327-4331

Kontakt

Prof. Dr. Wolfgang Witte
Robert Koch Institut
Wernigerode
E-mail: WitteW@rki.de

Konzeption der Staphylokokken-Maikroarrays

Die Array-Module (Oligo-arrays mit capture probes von 22 – 26 Basenpaaren) für Staphylokokken enthalten neben capture probes für 16S rDNA weitere Sonden (probes) für folgende Resistenzgene: *mecA* (Methicillinresistenz), *ermA*, *ermB*, *ermC* (Makrolid-Lincosamidin-Streptogramin-B-Resistenz), *aacA-aphD* (Aminoglykosidresistenz), *vatA*, *vatB*, *vatC* (Streptogramin-A-Resistenz), *tetK*, *tetM* (Oxytetracyclinresistenz), *mup* (Mupirocinresistenz), *fur1* (Fusidinsäureresistenz) sowie für SNP's in *rpoB* (Resistenz gegen Rifampicin), in der V-loop der 23S rRNA (Linezolidresistenz) und in *gyrA* (Chinolonresistenz). Weiterhin wurden Multiplex-PCR und Arraymodule für folgende Virulenz-assoziierten Gene etabliert, bei denen eine Beziehung zu bestimmten Krankheitsbildern (prädiktive Aussage) erwiesen ist: *tst* (Toxic-Schock-Syndrom), *eta*, *etb* (exfoliative Dermatitis), *lukS-lukF* (Panton-Valentin-Leukozidin bei nekrotisierenden Infektionen).

Konzeption der Enterokokken-Maikroarrays

Die Array-Module für Enterokokken enthalten toxonomisch-relevante Sonden für die Species-Identifizierung (D-Ala-D-Ala-Ligasen), sowie für die folgenden Resistenzgene: *vanA*, *vanB* (Glykopeptidresistenz), *ermB* (Streptogramin-B-Resistenz), *vatD*, *vatE* (Streptogramin-A-Resistenz), *aacA-aphD* (Aminoglykosid-Hochresistenz), *aadE* (Aminoglykosidresistenz), SNP's in der V-loop der 23S rRNA (Linezolidresistenz) sowie die Virulenz-assoziierten Gene *esp* (enterococcal surface protein) und *hyl* (Hyaluronidase). Als Marker für die CC17-Population mit besonderer Epidemizität (definiert über Multilocus-Sequenz-Typisierung) wurde das *purK-1*-Allel aufgenommen.

Die Evolution der Chlamydien – Einblicke in die Entwicklungsgeschichte bedeutender bakterieller Krankheitserreger

Matthias Horn und Michael Wagner

Chlamydien gehören mit jährlich über 60 Millionen Infektionen zu den bedeutendsten bakteriellen Krankheitserregern. Deren erst kürzlich entdeckten, nächsten Verwandten leben als Symbionten in frei lebenden Amöben und teilen ihren einzigartigen, intrazellulären Entwicklungszyklus. Die vergleichende und phylogenetische Untersuchung des Genoms eines dieser Chlamydien-verwandten Symbionten erlaubte nun neue Einblicke in die Evolution der Chlamydien und deren intrazellulären Lebensstils (1).

Symbiotische Chlamydien besitzen mit 2,4 Mb im Vergleich zu pathogenen Chlamydien (1-1,2 Mb) ein deutlich größeres Genom, das keine Anzeichen eines andauernden Prozesses der Reduktion der Genomgröße und - mit einer Ausnahme - keine Hinweise auf den kürzlichen Erwerb neuer Gene aufweist. Daher erlaubt der Vergleich des Genoms symbiotischer Chlamydien mit den Genomen der humanpathogenen Chlamydien Rückschlüsse auf die genetische Ausstattung und somit den Lebensstil des letzten gemeinsamen Vorfahren aller Chlamydien, der im Präkambrium, vor etwa 700 Millionen Jahren, gelebt haben dürfte.

Auffällig erscheint zunächst die große Zahl an im Genom symbiotischer Chlamydien codierter Proteine, die Ähnlichkeit zu Proteinen von pflanzlichen Plastiden oder Cyanobakterien aufweisen (9,4% aller Proteine). Diese deutet auf eine komplexe evolutionäre Beziehung zwischen Chlamydien und Cyanobakterien (oder Plastiden) hin und lässt vermuten, dass Chlamydien im Laufe ihrer Evolution – zumindest vorübergehend - mit Pflanzen assoziiert waren.

Trotz des größeren Genoms fehlen den symbiotischen wie den pathogenen Chlamydien Gene zur Durchführung einer Reihe essentieller Stoffwechselwege. Daher sind sie auf die Aufnahme entsprechender Metabolite (Nukleotide, einige Aminosäuren und Kofaktoren) aus ihren eukaryotischen Wirtszellen angewiesen, ein Schicksal, das moderne Chlamydien offenbar mit ihrem letzten gemeinsamen Vorfahren teilen, der, wie phylogenetische Untersuchungen belegen, bereits an intrazel-

luläres Leben in frühen Eukaryoten angepasst war. Bezüglich einiger Aspekte (wie etwa dem Zitronensäurezyklus und der oxidativen Phosphorylierung) war der letzte gemeinsame Vorfahre der Chlamydien jedoch deutlich unabhängiger von seiner Wirtszelle.

Neben speziellen Membranproteinen, die den Import von ATP (im Austausch gegen ADP) in die Bakterienzelle katalysieren (2), waren bereits weitere Mechanismen zur Interaktion mit eukaryontischen Wirtszellen im gemeinsamen Vorfahren der symbiotischen und pathogenen Chlamydien angelegt. So stammt unter anderem das Typ-III-Sekretionssystem, eine Art molekulare Spritze, die Effektorproteine in die Wirtszelle schleust, aus dieser Zeit. Auch eine spezifische Protease, mit deren Hilfe pathogene Chlamydien die Signalkaskade der Wirtszelle zur MHC-Expression unterbrechen, findet sich im Genom der symbiotischen Chlamydien und war bereits im Genom des Chlamydien-Urahnen codiert. Grundlegende Strategien intrazellulärer Bakterien zur Interaktion mit eukaryotischen Wirtszellen wurden also lange vor der Entstehung höherer Tiere und Pflanzen im Zusammenspiel mit frühen Einzellern entwickelt. Dieselben Mechanismen werden noch heute von modernen pathogenen Chlamydien bei der Infektion des Menschen verwendet.

Die vergleichende und phylogenetische Genomanalyse von humanpathogenen Bakterien und deren apathogenen Verwandten lieferte am Beispiel der Chlamydien neue Einblicke in die Evolution dieser bedeutenden Krankheitserreger. Wie das durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung der Bundesrepublik Deutschland im Rahmen des Kompetenznetzes Pathogenomik geförderte Projekt zeigt, bieten sich Chlamydien-verwandte Symbionten frei lebender Amöben als hervorragendes Modellsystem zur Untersuchung der Interaktion zwischen intrazellulären Bakterien und ihren Wirtszellen an. So bildeten diese Untersuchungen unter anderem die Grundlage für die kürzliche Entdeckung und Charakterisierung des ersten Membranproteins, das intaktes NAD+

importiert und somit integraler Bestandteil einer einzigartigen Anpassung symbiotischer Chlamydien an ihren intrazellulären Lebensstil ist (3).

Literatur

1. Horn et al. (2004) *Illuminating the evolutionary history of chlamydiae*. *Science* 304:728-730.
2. Schmitz-Esser et al. (2004) *ATP/ADP translocases: a common feature of obligate intracellular amoebal symbionts related to chlamydiae and rickettsiae*. *J. Bacteriol.* 186:683-691.
3. Haferkamp et al. (2004) *A candidate NAD⁺ transporter in an intracellular bacterial symbiont related to chlamydiae*. *Nature* 432:622-625.

Kontakt

Dr. Matthias Horn
 Department für Mikrobielle Ökologie
 Universität Wien
 E-mail: horn@microbial-ecology.net

Prof. Dr. Michael Wagner
 Department für Mikrobielle Ökologie
 Universität Wien
 E-mail: wagner@microbial-ecology.net

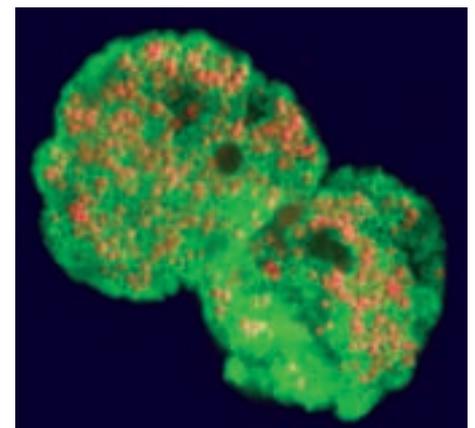


Abb: Symbiotische Chlamydien innerhalb ihrer natürlichen Wirtszellen, frei lebenden Amöben. Chlamydien und Amöben wurden mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung und spezifischen Sonden angefärbt; dargestellt ist ein optischer Schnitt durch die Wirtszelle (© Science/AAAS).

Impressum

GenomXPress Sonderausgabe · September 2005

Herausgeber

Die wissenschaftlichen Koordinierungsstellen
des Förderprogramms Genomforschung an
Mikroorganismen (GenoMik)

Redaktion

Dr. Werner Selbitschka (**GenoMik Bielefeld**)
Universität Bielefeld, Lehrstuhl für Genetik
Postfach 100131, 33501 Bielefeld
werner.selbitschka@genetik.uni-bielefeld.de

Dr. Petra Ehrenreich (**GenoMik Göttingen**)
Universität Göttingen, Institut für Mikrobiologie
und Genetik
Grisebachstrasse 8, 37077 Göttingen
pehrenr@gwdg.de

Dr. Dietrich Trzeciok (**GenoMik Göttingen**)
Universität Göttingen, Institut für Mikrobiologie
und Genetik
Grisebachstrasse 8, 37077 Göttingen
dtrzeci@gwdg.de

PD Dr. Michael Kuhn (**PathoGenoMik Würzburg**)
Universität Würzburg, Biozentrum
Am Hubland, 97074 Würzburg
kuhn@biozentrum.uni-wuerzburg.de

Elena Strzelczyk, (**GABI Geschäftsstelle**)
c/o Max Planck Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie
Am Mühlenberg 1, 14476 Golm
strzelczyk@mpimp-golm.mpg.de

Der Inhalt von namentlich gezeichneten Artikeln liegt in Verantwortung des jeweiligen Autors.

ISSN 1617-562X Dieser Newsletter wird aus Mitteln des BMBF gefördert.
Layout & Satz: Dirk Biermann, biermann@potsdam.de · Druck: sd:k Satz & Druck, Teltow