

Jahresbericht 2008

caesar

 center of advanced
european studies
and research

www.caesar.de



Stiftung caesar -
assoziiert mit der
Max-Planck-Gesellschaft

Inhaltsverzeichnis

Vorwort	7
Annukka Aho, Hans-Ulrich Fried Schrittmacherkanäle im Riechkolben	9
Normann Goodwin, Timo Strünker Die Wirkung von Progesteron auf Spermien: Nichts Genaues weiß man...	17
Astrid Loogen, Reinhard Seifert Ein außergewöhnlicher Ionenkanal kontrolliert das Schwimmverhalten von Seeigelspermien	25
Johannes Lenz, Stephan Irsen Herstellung von Röntgenoptiken mit fokussierten Ionenstrahlen	35
Manfred Lacher Schwarzer Kiefernprachtkäfer als Vorbild für mikrotechnischen Infrarotsensor	41
Catarina Pietschmann Wo, bitte, geht's denn hier zum Ei?	47
Publikationen	57
Personal / Finanzen	62
Organe der Stiftung	67

caesar



center of advanced
european studies
and research

Jahresbericht 2008



Vorwort zum Jahresbericht caesar 2008

Die Übergangsphase bei caesar ist abgeschlossen, seit Beginn des Jahres 2008 arbeitet das Forschungszentrum auf dem Gebiet der Neurowissenschaften. Alle im Rahmen der früheren Ausrichtung begonnenen Projekte und Dissertationen konnten erfolgreich zum Abschluss gebracht werden, die Mitarbeiter fanden neue Stellen in der Wissenschaft oder in der Industrie. Hervorzuheben ist, dass elf Wissenschaftler einen Ruf an eine Hochschule erhielten.

Im Januar 2008 hat Prof. Kaupp seine Tätigkeit als erster Wissenschaftlicher Direktor am Forschungszentrum aufgenommen. Unter seiner Leitung beginnt das neue Konzept von caesar Gestalt anzunehmen. Seine Abteilung „Molekulare Neurosensorik“ befasst sich mit der Frage, wie Signale in Zellen verarbeitet werden. Kaupp und seine Mitarbeiter untersuchen, auf welche Weise Zellen Reize detektieren und in eine zelluläre Antwort umwandeln. Konkret geht es um sensorische Reize wie Licht und Duftstoffe, aber auch um chemische Sensorik, wie sie bei der Befruchtung von Eizellen wirksam wird. Die ersten Artikel im vorliegenden Jahresbericht geben einen kleinen Einblick in dieses Feld.

Auch die wissenschaftliche Infrastruktur von caesar wurde auf die neue Forschungsrichtung ausgerichtet, das technische Personal hat sich für die neuen Anforderungen fortgebildet und vorbereitet. Dies gilt insbesondere für die Elektronenmikroskopie und den Reinraum mit der Arbeitsgruppe Mikrosystemtechnologie. Die beiden Bereiche verstehen sich nicht allein

als Serviceeinrichtungen, sondern betreiben auch eigene Forschung. Aspekte ihrer Arbeit sind ebenfalls im Folgenden nachzulesen.

Mit der Berufung des zweiten Wissenschaftlichen Direktors wird der Neuaufbau von caesar fortgesetzt. Zusätzlich werden wir mehrere Forschergruppen einrichten. Besonders erfreulich ist, dass die Firma Boehringer Ingelheim zugesagt hat, eine Forschergruppe zu finanzieren.

Eine wesentliche Säule des Gesamtkonzepts von caesar ist die starke Vernetzung mit den universitären und anderen Forschungseinrichtungen in der Region sowie mit der Wirtschaft. Die Universität Bonn ist dabei ein starker und verlässlicher Partner, mit dem wir mehrere wissenschaftliche Projekte gemeinsam planen und durchführen. Neu hinzugekommen am Standort Bonn ist das Deutsche Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen (DZNE). caesar wird mit dem DZNE wissenschaftlich eng kooperieren. Wir begrüßen es sehr, dass der Aufbaustab unter der Leitung von Prof. Pierluigi Nicotera in den Räumen des Forschungszentrums caesar seine Arbeit aufgenommen hat.

Die Ausgründungsplattform Life-Science-Inkubator als dritte Säule des Konzepts hat im Dezember 2008 die notwendigen Finanzierungszusagen und ihre endgültige rechtliche Form bekommen. Die ersten Ausgründungsprojekte sind ausgewählt und nehmen 2009 ihre Arbeit auf.

caesar entwickelt sich damit zügig zu einem

neuen Kristallisationskeim der neuro-
wissenschaftlichen Forschung. Im Jahr 2008
sind wir wichtige Schritte vorangekommen.
Die wissenschaftliche Arbeit ist hervorragend
angelaufen. Mit der Einrichtung des

Life-Science-Inkubators können wir die
Forschungsergebnisse zudem direkt in die
Anwendung bringen. Der gute Start stimmt
optimistisch, dass caesar in eine erfolgreiche
Zukunft blicken kann.

Prof. Dr. Peter Gruss
Präsident der Max-Planck-Gesellschaft
Vorsitzender des Stiftungsrates



Prof. Dr. U. Benjamin Kaupp
Wissenschaftlicher Direktor



Dr. Hartwig Bechte
Kaufmännischer Geschäftsführer



Schrittmacherkanäle im Riechkolben

ANNUKKA AHO UND HANS-ULRICH FRIED
Molekulare Neurosensorik

In den letzten Jahren hat der Geruchssinn die Aufmerksamkeit einer stetig wachsenden Zahl von Wissenschaftlern erregt, doch noch immer können wir nicht vollständig erklären, wie ein Geruchseindruck entsteht. Neueste Forschungsergebnisse legen nahe, dass die rhythmische Aktivität von Nervenzellen eine wichtige Rolle bei der Entstehung eines Geruchseindrucks spielt. Wir untersuchen Schrittmacherkanäle, die diese rhythmische Aktivität steuern könnten, in einer zentralen Region des Geruchssystems, dem Riechkolben.

Der Riechkolben

Der Geruchssinn spielt eine wesentliche Rolle in unserem Leben: Gerüche können Erinnerungen und Emotionen auslösen und sie beeinflussen unsere Stimmung. Was wir für den Geschmack eines köstlichen Essens halten, ist vielmehr dessen Geruch, denn der Geschmackssinn kann nur fünf Geschmacksrichtungen unterscheiden: Süß, sauer, salzig, bitter und umami (herzhaft). Die Aromen und Geschmacksnuancen, die eine Speise unverwechselbar machen, entstehen dagegen in der Nase. Im Tierreich spielt der Geruchssinn eine wichtige Rolle bei der Nahrungssuche, der Markierung von Revieren, der Vermeidung von giftigen Substanzen sowie der Erkennung von Fressfeinden und Gruppenmitgliedern [1]. Außerdem beeinflusst der Geruchssinn das soziale Verhalten von Tieren, beispielsweise die Partnerwahl [2].

Doch wie entsteht ein Geruchseindruck? Wenn wir einatmen, gelangen zahlreiche Duftstoffmoleküle zur Riechschleimhaut in der Nasenhöhle. Hier befinden sich Riechzellen, die auf ihrer Oberfläche Bindeproteine für Duftstoffe (Duftstoffrezeptoren) tragen. Riechzellen sind

spezialisierte Nervenzellen, die einen Dendriten und ein Axon besitzen (der prinzipielle Aufbau einer Nervenzelle ist in Abbildung 1 dargestellt).

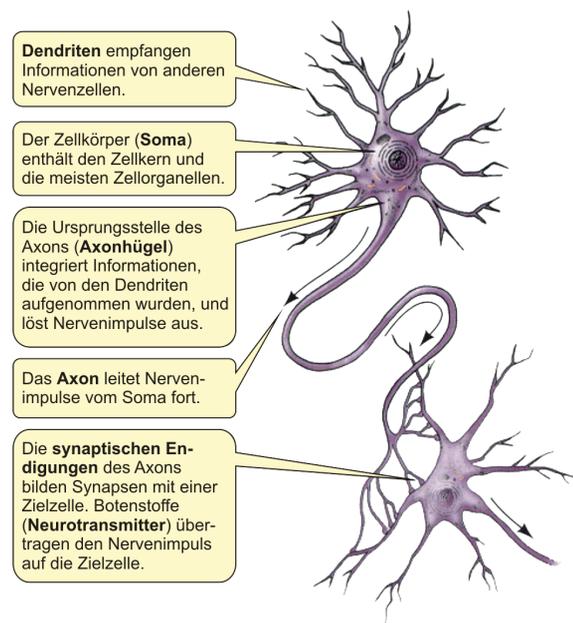


Abbildung 1: Schematische Darstellung einer Nervenzelle. Verändert nach Purves, Sadava, Orians, Heller „Biologie“ Elsevier Spektrum Akademischer Verlag, 7. Auflage, S. 1051 Abb. 44.2a.

Duftstoffe aus der Atemluft binden an diese Duftstoffrezeptoren und aktivieren die Riechzellen. Die Riechzellen senden daraufhin über

ihre Axone ein elektrisches Signal an einen Abschnitt des Gehirns, der Riechkolben genannt wird. Der Riechkolben ist die erste Schaltstelle im Gehirn, in der Geruchssignale verarbeitet werden. Er ist beispielsweise wichtig, um Gerüche voneinander zu unterscheiden [3]. Geruchssignale werden im Riechkolben in Netzwerken aus miteinander verschalteten Nervenzellen verarbeitet. Die unterschiedlichen Netzwerkzellen können durch Färbungen sichtbar gemacht werden (Abbildung 2). Bei diesen Färbungen verwendet man Antikörper, die hochspezifisch an bestimmte Proteine binden und diese dadurch markieren. Besonders gut eignen sich Antikörper gegen Proteine, die Calcium-Ionen binden (z. B. Calbindin, Calretinin und Villip-1), oder Antikörper gegen Enzyme, die Neurotransmitter bilden (z. B. Stickoxidsynthase), sowie gegen Neurotransmitter selbst. Diese Proteine kommen nicht in allen Zellen gleichermaßen vor, sondern sie sind nur in einigen Zelltypen vorhanden. Antikörper, die diese Proteine erkennen, werden daher oft als Markerantikörper bezeichnet.

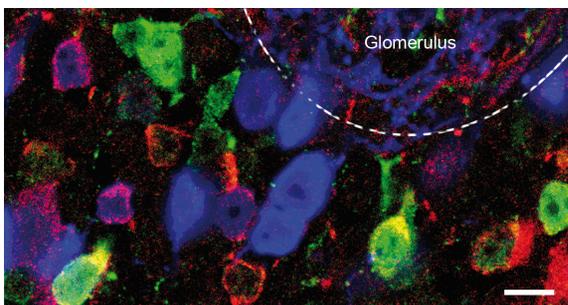


Abbildung 2: Verschiedene Populationen juxtaglomerulärer Zellen. Die Färbung mit drei verschiedenen Markerantikörpern macht unterschiedliche Zellpopulationen sichtbar. Die blau gefärbten Zellen verfügen über Villip-1, die grünen Zellen verfügen über Calretinin und die roten Zellen besitzen Stickoxidsynthase. Darüber hinaus gibt es auch Zellen, in denen Villip-1 und Calretinin (gelb) oder Villip-1 und Stickoxidsynthase (violett) vorkommen. Größenstandard: 10 µm.

Lokalisation von Schrittmacherkanälen im Riechkolben

Aktuelle Forschungsergebnisse zeigen, dass die rhythmische Aktivität von Nervenzellen (Oszillationen) für die Verarbeitung von Gerüchen eine wichtige Rolle spielt [4]. Dabei dienen einzelne Zellen als Taktgeber, die den Rhythmus bestimmen. Wie solche Oszillationen entstehen, ist am Beispiel des Herzschlags intensiv untersucht worden. Die Entstehung und Modulation des Herzschlags beruht auf Ionenkanälen, die sich fortlaufend gegenseitig aktivieren. Zu diesen Ionenkanälen zählen die hyperpolarisationsaktivierten und zyklisch Nucleotid-gesteuerten Kanäle (*hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated channels*; HCN-Kanäle). Da diese Kanäle für ihre Rolle als Schrittmacher elektrischer Aktivität im Herzen [5] und im Gehirn [6] bekannt sind, nennt man sie Schrittmacherkanäle. Um ein Ergebnis unserer Forschung schon jetzt vorwegzunehmen: Auch im Riechkolben kommen HCN-Kanäle vor. Daher stellt sich die Frage, ob HCN-Kanäle auch für die Entstehung der Oszillationen im Riechkolben und somit für die Verarbeitung von Gerüchen generell wichtig sind.

HCN-Kanäle bestehen aus vier Untereinheiten, die sich um eine zentrale Pore anordnen. Bei Säugetieren gibt es vier verschiedene Typen von Untereinheiten - HCN1 bis HCN4 [7]. Ein HCN-Kanal kann sowohl aus gleichen (homomere Kanäle), als auch aus unterschiedlichen Untereinheiten (heteromere Kanäle) aufgebaut sein. Welche Isoformzusammensetzungen tatsächlich im Gewebe auftreten und welche Eigenschaften heteromere HCN-Kanäle besitzen, ist nur in wenigen Fällen bekannt. Die Eigenschaften von homomeren HCN-

Kanälen sind in Modellsystemen untersucht worden [8]. HCN1-Kanäle öffnen schnell bei einer negativen elektrischen Spannung, die an der Zellmembran anliegt (Hyperpolarisation), HCN2, HCN3 und HCN4 hingegen öffnen langsamer. Der Botenstoff cAMP verschiebt die Spannungsabhängigkeit, so dass HCN2- und HCN4-Kanäle schon bei deutlich positiverer Spannung öffnen; HCN1 und HCN3 reagieren jedoch kaum auf cAMP. Diese Eigenschaften bedeuten, dass die Frequenz und Modulierbarkeit von Oszillationen, an deren Entstehung HCN-Kanäle beteiligt sind, stark von der Untereinheitenzusammensetzung des HCN-Kanals abhängen. Das heißt, schnelle Oszillationen können durch HCN1-Kanäle bedingt werden, und stark in der Frequenz modulierbare Oszillationen benötigen die Beteiligung von HCN2 beziehungsweise HCN4.

Um die Bedeutung der HCN-Kanäle im Gewebe besser zu verstehen, haben wir Antikörper erzeugt, die jeweils spezifisch die verschiedenen HCN-Untereinheiten erkennen. Wo genau

die Untereinheiten vorkommen, haben wir durch Antikörper-Färbungen untersucht. Diese Färbungen zeigen, dass alle vier HCN-Untereinheiten sehr häufig im Riechkolben vorkommen. Sie sind aber nicht gleichmäßig im Riechkolben verteilt, sondern jede Untereinheit besitzt ein charakteristisches Verteilungsmuster (siehe Abbildung 3). Dies bedeutet, dass verschiedene HCN-Kanäle in unterschiedlichen Zellen vorkommen.

Verschiedene Antikörper-Färbungen können kombiniert werden. Die Kombination von Färbungen ermöglicht es, die Verteilung von mehreren HCN-Untereinheiten gleichzeitig in derselben Zelle zu untersuchen (Abbildung 4A). Wir haben die Lokalisation mehrerer HCN-Untereinheiten an derselben Stelle einer Zelle ("Kokalisation") mittels der konfokalen *laser-scanning*-Mikroskopie bestimmt (siehe Methoden-Box 1). Solche Untersuchungen der Kokalisation liefern Anhaltspunkte, ob heteromere HCN-Kanäle vorkommen, welche HCN-Untereinheiten daran beteiligt sind und

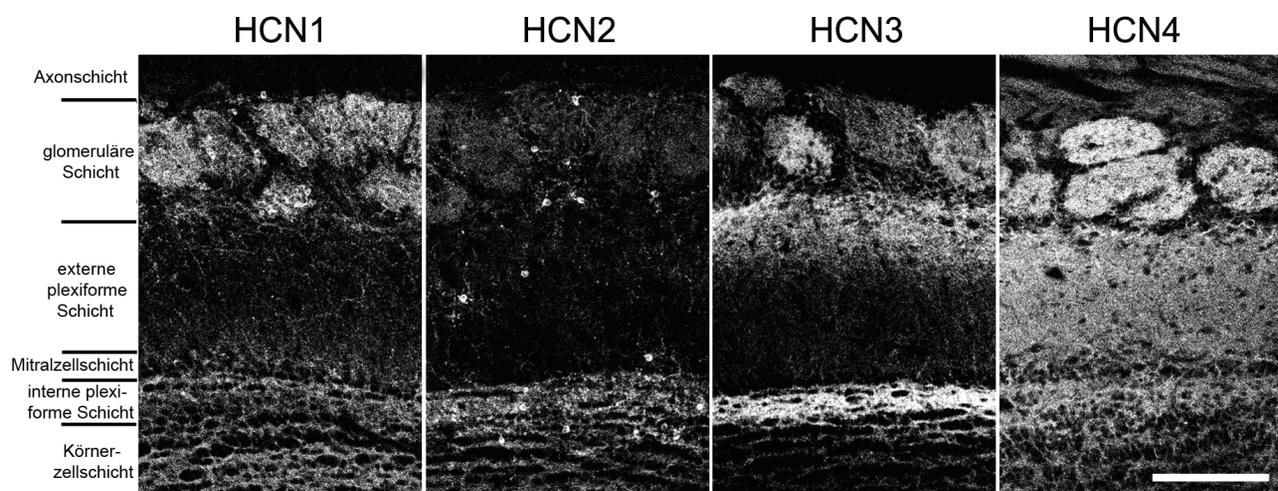


Abbildung 3: Verteilung der HCN-Isoformen im Riechkolben. Wie viele Regionen im Gehirn, besteht der Riechkolben aus Nervenzellen, die in Schichten angeordnet sind: Von außen nach innen bezeichnet man die Schichten als Axonschicht, glomeruläre Schicht, externe plexiforme Schicht, Mitralzellschicht, interne plexiforme Schicht und Körnerzellschicht. Größenstandard: 100 µm.

in welchen Zellen heteromere bzw. homomere Kanäle auftreten. Wir beobachten, dass verschiedene Kombinationen aus zwei und drei HCN-Isoformen kolokalisiert vorkommen. Dieses Resultat ist überraschend, da bisher nur wenige Beispiele für die Kolokalisation von HCN-Isoformen im Gehirn bekannt waren und unsere Färbungen das erste Mal überhaupt auf HCN-Kanäle hinweisen, die aus drei verschiedenen Untereinheiten aufgebaut sein könnten. Indem wir HCN- und Marker-Antikörper in Mehrfachfärbungen kombiniert haben, konnten wir untersuchen, in welchen Zellen die HCN-Kanäle vorkommen (Abbildung 4B). Dabei stellte sich heraus, dass etwa die Hälfte aller untersuchten Zelltypen HCN-Kanäle ausbildet. Diese bemerkenswerte Häufigkeit der

HCN-Kanäle bekräftigt unsere Vermutung, dass HCN-Kanäle für den Geruchssinn besonders wichtig sind.

Untersuchung heteromerer HCN-Kanäle

Die ausgeprägte Kolokalisation der verschiedenen HCN-Untereinheiten im Riechkolben deutet darauf hin, dass HCN-Kanäle häufig als Heteromere vorkommen. Um den direkten Kontakt zwischen den Untereinheiten eines solchen heteromeren HCN-Kanals nachzuweisen, haben wir Ko-Immunopräzipitationen (siehe Methoden-Box 2) durchgeführt. Unsere Ergebnisse zeigen, dass HCN-Kanäle im Riechkolben tatsächlich heteromere Kanäle bilden, und dass alle bisher getesteten HCN-Kombinationen vorkommen.

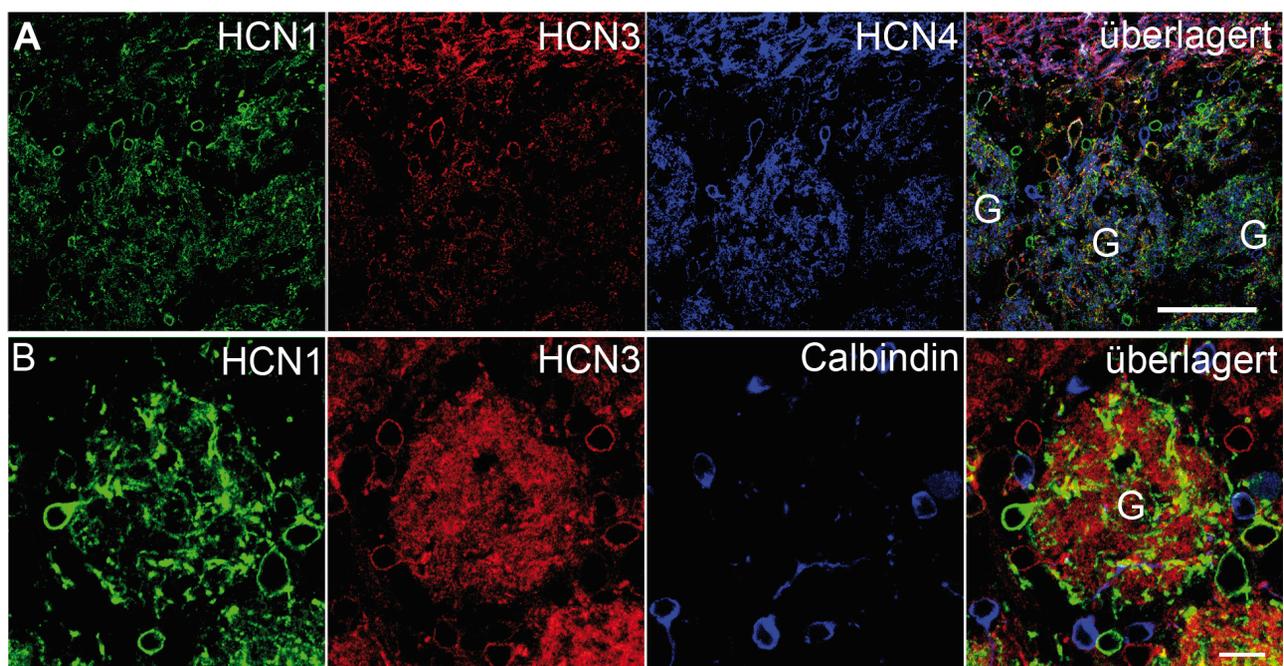


Abbildung 4: Kolokalisation von HCN-Untereinheiten und Identifikation verschiedener Zelltypen mit HCN-Kanälen. A. Mehrfachfärbung, die gleichzeitig die Verteilung von drei HCN-Untereinheiten (HCN1, HCN2 und HCN3) zeigt. Die Überlagerung der Färbungen (ganz rechts) zeigt die Kolokalisation unterschiedlicher Untereinheiten (violette Bereiche: HCN3 + HCN4, gelbe Bereiche: HCN1 + HCN3, weiße Bereiche: HCN1 + HCN3 + HCN4). Größenstandard: 50 μ m. B. Mehrfachfärbung mit Marker- (Calbindin) und HCN-Antikörpern (HCN1 und HCN3) zeigt, ob die bekannten Zellpopulationen (hier die „Calbindin-positive“ Population) HCN-Kanäle besitzen. Größenstandard: 10 μ m, G: Glomerulus.

Konfokale *laser-scanning*-Mikroskopie

Die Konfokalmikroskopie wurde 1955 von Marvin Minsky erfunden: Seine Idee war, eine kleine Lochblende in der Bildebene eines Lichtmikroskops zu platzieren. Bei modernen konfokalen *laser-scanning*-Mikroskopen verwendet man Laser, deren Licht auf einen sehr kleinen Punkt in der Probe fokussiert ist. Durch das Laserlicht werden spezielle Farbstoffe zum Leuchten (Fluoreszieren) angeregt. Durch die Lochblende wird die Fluoreszenz nur auf einen Punkt in der Bildebene abgebildet. So beobachtet man zwar nur einen kleinen Ausschnitt, aber vermeidet dafür den störenden Einfluss von Licht aus tiefer oder höher gelegenen Bereichen der Probe. Um ein vollständiges Bild der Probe zu erhalten, muss man die Probe bewegen und das Bild anschließend Punkt für Punkt zusammensetzen. Konfokale *laser-scanning*-Mikroskope können einige Millionen Punkte in der Sekunde aufnehmen und Bilder mit einer Auflösung von etwa 250 nm erzeugen.

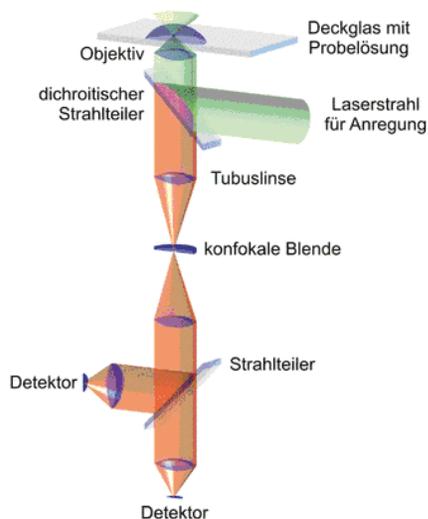


Abbildung: Aufbau eines konfokalen Mikroskops.

Das grün dargestellte Anregungslicht wird von dem dichroitischen Strahlteiler umgelenkt und durch das Objektiv auf einen Punkt in der Probe fokussiert. Das dort entstehende Fluoreszenzlicht wird zum Teil vom gleichen Objektiv wieder gesammelt, passiert den dichroitischen Strahlteiler und wird von der Tubuslinse auf die konfokale Blende fokussiert. Nur Licht, welches im Brennpunkt des Objektivs erzeugt wurde, kann die Blende passieren. Dieses Licht wird von einem Strahlteiler z. B. nach Farbe oder Polarisation aufgetrennt und von den Detektoren registriert.

Methoden-Box 1: Prinzip der konfokalen *laser-scanning*-Mikroskopie.

Über die Funktion von heteromeren HCN-Kanälen im Riechkolben ist bisher zwar nur wenig bekannt, es ist aber wahrscheinlich, dass die Zellen des Riechkolbens heteromere Kanäle nutzen, um aus dem begrenzten Repertoire von vier Kanaluntereinheiten eine Vielzahl neuer Kanäle mit verschiedensten Eigenschaften zu bilden. Somit könnte jede Zelle ihre elektrischen Eigenschaften mittels maßgeschneiderter HCN-Kanäle auf die ihr zugedachte Rolle im Netzwerk abstimmen. Dabei ist erstaunlich, wie viele verschiedene

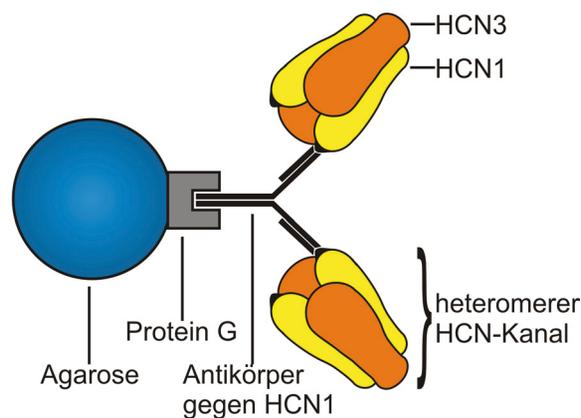
Zellen mit jeweils unterschiedlichen maßgeschneiderten HCN-Kanälen es gibt – offensichtlich ist die Vielfalt an Zellen im Riechkolben deutlich größer als bislang vermutet.

Ausblick

Unsere Ergebnisse provozieren eine Reihe interessanter Fragen: Im Riechkolben scheinen heteromere HCN-Kanäle eher die Regel als die Ausnahme zu sein, doch ist dies auch in anderen Gehirnregionen der Fall? Welche Eigenschaften haben heteromere Kanäle und

Ko-Immunopräzipitation (Ko-IP)

Die Immunopräzipitation ist eine biochemische Methode zur Fällung von bestimmten Proteinen aus einem Proteingemisch. Hierzu benötigt man einen Antikörper, der ein anderes Protein (hier Protein X genannt) hochspezifisch bindet. Wie bei einem Teich mit vielen verschiedenen Fischarten versucht man mit Hilfe eines spezifischen Köders (des Antikörpers) eine einzige Fischart herauszufangen. Als Haken dient Protein G, ein Antikörper-bindendes Protein. Als Angel dient ein Trägermaterial, beispielsweise kleine Kugeln aus Agarose, einer Gelatin-ähnlichen Substanz. Das gesuchte Protein X bindet an den Antikörper, der wiederum an Protein G-Agarose gekoppelt ist, und lässt sich somit von den anderen Komponenten des Gemisches durch Zentrifugation abtrennen. Ein anderes Protein kann jedoch mitgefällt (d.h. kopräzipitiert) werden, wenn es in sehr engem Kontakt zum Protein X steht, d.h. wenn die beiden Proteine einen Proteinkomplex bilden. Dies ist beispielsweise der Fall, wenn beide Proteine Untereinheiten desselben Kanals sind. In diesem Fall spricht man von einer Ko-Immunopräzipitation. Mittels der Ko-Immunopräzipitation können unbekannte Komponenten eines Proteinkomplexes isoliert und anschließend identifiziert werden. Wir verwenden die Ko-Immunopräzipitation außerdem um nachzuweisen, dass die verschiedenen HCN-Untereinheiten heteromere Kanäle (d.h. Kanäle, die aus verschiedenen Untereinheiten zusammengesetzt sind) bilden.



Methoden-Box 2: Prinzip der Ko-Immunopräzipitation.

wieso gibt es offensichtlich so viele verschiedene Varianten heteromere Kanäle? Weshalb ist HCN3 im Riechkolben nahezu ausschließlich mit anderen HCN-Untereinheiten kolokalisiert? Welche Rolle spielen HCN-Kanäle für die Oszillationen im Riechkolben? Um diese Fragen zu beantworten, wollen wir zum Beispiel die Eigenschaften von heteromeren HCN-Kanälen untersuchen. Nur durch die Untersuchung des Aufbaus und der Eigenschaften der

HCN-Kanäle können wir verstehen, welche Rolle HCN-Kanäle bei der Verarbeitung von Geruchsinformationen im Riechkolben spielen. Mit unserer Forschung wollen wir die Eigenschaften homomere und heteromere HCN-Kanäle im Gewebe verstehen und somit dazu beitragen, die molekularen Mechanismen der Geruchsverarbeitung aufzuklären.

Literatur

- [1] Ache BW, Young JM, "Olfaction: diverse species, conserved principles." *Neuron* **48**, 417-430 (2005).
- [2] Brennan PA, "The nose knows who's who: chemosensory individuality and mate recognition in mice." *Horm. Behav.* **46**, 231-240 (2004).
- [3] Lledo PM, Gheusi G, Vincent JD, "Information processing in the mammalian olfactory system." *Physiol. Rev.* **85**, 281-317 (2005).
- [4] Fontanini A, Bower JM, "Slow-waves in the olfactory system: an olfactory perspective on cortical rhythms." *Trends Neurosci.* **29**, 429-37 (2006).
- [5] Di Francesco D, "Pacemaker mechanisms in cardiac tissue." *Annu. Rev. Physiol.* **55**, 455-472 (1993).
- [6] Pape HC, "Queer current and pacemaker: the hyperpolarization-activated cation current in neurons." *Annu. Rev. Physiol.* **58**, 229-327 (1996).
- [7] Santoro B, Tibbs GR, "The HCN gene family: molecular basis of the hyperpolarization-activated pacemaker channels." *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **868**, 741-764 (1999).
- [8] Kaupp UB, Seifert R, "Molecular diversity of pacemaker ion channels." *Ann. Rev. Physiol.* **63**, 235-257 (2001).



Die Wirkung von Progesteron auf Spermien: Nichts Genaues weiß man...

NORMANN GOODWIN UND TIMO STRÜNKER
Molekulare Neurosensorik

Progesteron löst bei Spermien einen schnellen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration aus. Vermutlich spielen diese Ca^{2+} -Signale eine wichtige Rolle bei der Befruchtung der Eizelle. Wie die Progesteronrezeptoren der Spermien aussehen und wo diese lokalisiert sind, ist unklar. Der Signalweg und die beteiligten intrazellulären Signalmoleküle sind ebenfalls unbekannt. Mit neuen wissenschaftlichen Ansätzen und Werkzeugen möchten wir die physiologische Bedeutung von Progesteron in Spermien aufklären.

Unsere Körperfunktionen werden durch Hormone kontrolliert

Hormone (vom griechischen *hormon* für „antreibend“) sind chemische Botenstoffe, die von spezialisierten Zellen des Körpers ausgeschüttet werden und in ihren Zielzellen bzw. -geweben eine Reaktion auslösen. Neben Energiehaushalt und Stoffwechsel steuern Hormone Wachstum, Entwicklung und Verhalten. Die Zielzellen befinden sich oft weit entfernt vom Produktionsort der Hormone. Manche Hormone werden daher über die Blutbahn zu ihrem Bestimmungsort transportiert; man spricht von einer endokrinen Signalübertragung. Die hormonproduzierenden Zellen sind oft Teil eines Organs, einer endokrinen Drüse. Die Schilddrüse, die Nebennieren, die Leydig-Zellen im Hoden und die Eierstöcke sind Beispiele für wichtige endokrine Drüsen im menschlichen Körper.

Es gibt fünf verschiedene Klassen von Steroidhormonen

Steroidhormone sind fettlösliche Moleküle, die hauptsächlich in der Nebennierenrinde,

den Hoden bzw. Eierstöcken und der Plazenta synthetisiert werden. Auch Nervenzellen stellen Steroidhormone (Neurosteroide) her. Die Steroidhormone werden entsprechend ihrer Wirkung in verschiedene Klassen unterteilt. Glucocorticosteroide wie das Cortisol sind wichtige Stresshormone, die Energiereserven bei körperlicher und/oder psychischer Belastung mobilisieren. Mineralcorticosteroide – der wichtigste Vertreter ist Aldosteron – regulieren den Salz- und Flüssigkeitshaushalt des Körpers. Gluco- und Mineralcorticosteroide werden aus der Nebennierenrinde abgegeben. Die drei Klassen von Steroidhormonen, die in den Hoden bzw. Eierstöcken produziert werden, regulieren Wachstum, Fortpflanzungszyklen und das Fortpflanzungsverhalten. Androgene (Testosteron), Östrogene (Östradiol) und Gestagene (Progesteron) findet man sowohl bei Männern als auch bei Frauen; die Mengenverhältnisse unterscheiden sich bei Mann und Frau deutlich. Steroidhormone werden aus Cholesterin gebildet. Abbildung 1 zeigt die chemische Struktur wichtiger Steroidhormone.

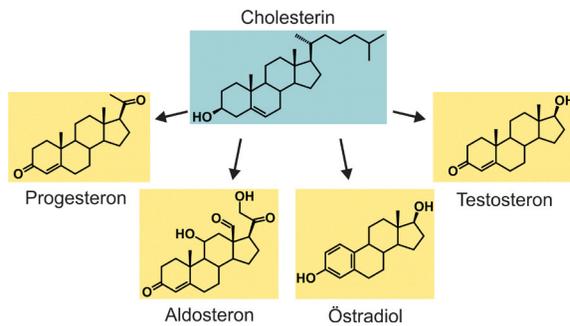


Abbildung 1: Steroidhormone werden aus Cholesterin gebildet.

Steroidhormone binden an intrazelluläre Rezeptoren und beeinflussen die Genexpression - der klassische Signalweg

Hormone aktivieren spezifische Rezeptorproteine der Zielzellen. Die Aktivierung der Rezeptoren löst eine zelluläre Reaktion aus. Steroidhormone sind sehr gut fettlöslich (lipophil) und können die Zellmembran leicht passieren. Sie binden an spezielle Rezeptoren, die sich im Zytoplasma (Mineralcorticoid-, Glucocorticoid-, Androgen- und Gestagenrezeptoren) oder im Zellkern (Östrogenrezeptoren) der Zielzelle befinden. Durch die Bindung des Steroidhormons bildet sich ein Hormon-Rezeptor-Komplex. Zwei dieser Hormon-Rezeptor-Komplexe lagern sich zusammen (*Rezeptor-Dimerisierung*) und wandern in den Zellkern (*Translokation*). Im Zellkern bindet das Rezeptor-Dimer an spezifische Elemente der DNA. Dadurch wird die Synthese bestimmter Proteine gesteigert oder herabgesetzt. In Abbildung 2 ist der Signalweg von Steroidhormonen dargestellt.

Die genomische Wirkung von Steroidhormonen ist ein sehr langsamer Signalweg, der lang anhaltende Veränderungen auslöst – die Neusynthese von Proteinen dauert Minuten bis hin zu Tagen. Dieser langsame, genomische, auch

klassisch genannte Signalweg wurde bereits in den 60er Jahren entdeckt und beschrieben.

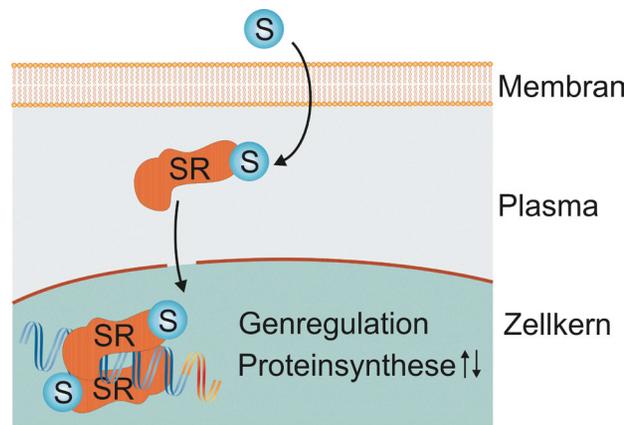


Abbildung 2: Genomische Wirkung von Steroidhormonen. Steroidhormone (S) passieren die Plasmamembran und binden an intrazelluläre Steroidhormonrezeptoren (SR). Es bilden sich dimere Hormon-Rezeptor-Komplexe, die in den Zellkern wandern und dort an die DNA binden. Dadurch wird die Synthese bestimmter Proteine gesteigert oder herabgesetzt.

Schnelle nicht-genomische Wirkung von Steroidhormonen

Nicht alle Reaktionen von Zellen auf Steroidhormone lassen sich auf den klassischen Signalweg zurückführen. Bereits 1942 beobachteten Wissenschaftler, dass eine Steroidinjektion in die Bauchhöhle von Ratten zu einer sekundenschnellen Bewusstlosigkeit der Tiere führt: Eine Reaktion, der ein schneller, nicht-genomischer Signalweg zu Grunde liegen muss. Heute weiß man, dass manche Steroide – die sogenannten neuroaktiven Steroide – an Rezeptoren für Neurotransmitter (GABA_A-Rezeptoren) binden und diese modulieren. Ein weiteres Beispiel für eine nicht-genomische Steroidwirkung ist die Wirkung von Progesteron auf menschliche Spermien. In reifen Spermien kommt die Proteinsynthese zum

Erliegen; der klassische, genomische Signalweg ist daher ausgeschlossen. Abbildung 3 zeigt Ca^{2+} -Signale in menschlichen Spermien nach der Stimulation mit verschiedenen Progesteronkonzentrationen. Um das Ca^{2+} -Signal zu verfolgen, wurden die Spermien mit einem Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoff beladen. Die Fluoreszenzintensität des Farbstoffs zeigt die Änderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zuverlässig an. Die Ca^{2+} -Konzentration steigt ohne Verzögerung (*Latenz*) an - ein deutlicher Beweis für einen nicht-genomischen Signalweg.

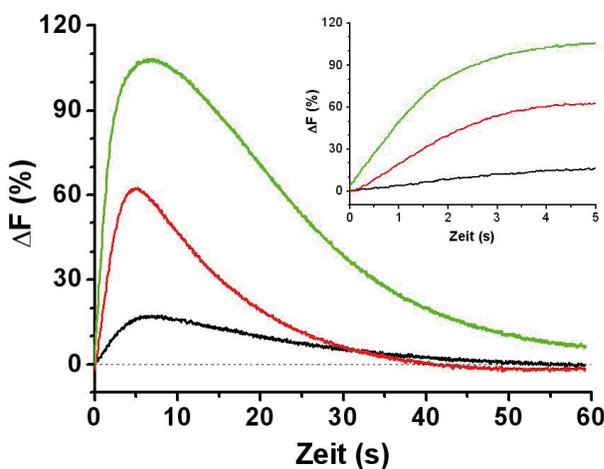


Abbildung 3: Progesteron-induzierte Ca^{2+} -Signale in menschlichen Spermien. Menschliche Spermien (2×10^7 Spermien/ml) wurden in einer *Stopped-Flow*-Apparatur (Technik-Box) mit Progesteron gemischt. Änderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration wurden mit einem Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoff verfolgt ($F = \text{Fluoreszenz}$). Die Spermien wurden mit 15 nM (schwarz), 50 nM (rot) bzw. 1,25 μM (grün) Progesteron stimuliert. Die Stimulation erfolgte zum Zeitpunkt $t = 0$. Das Insert zeigt die ersten 5 Sekunden nach der Stimulation.

Die Spermien reagieren sehr empfindlich auf Progesteron: Bereits nanomolare Konzentrationen lösen ein Ca^{2+} -Signal aus. Die Ca^{2+} -Signale in den Spermien sind transient, das heißt, nach ca. einer Minute kehrt die Ca^{2+} -

Konzentration zu ihrem Ausgangswert zurück. Der Ca^{2+} -Anstieg setzt sich vermutlich aus einer Kombination von Ca^{2+} -Einstrom und einer Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern zusammen. Ähnliche Ca^{2+} -Signale findet man bei allen bisher untersuchten Säugetierspermien.

Welche Rolle spielen die Ca^{2+} -Signale bei der Eibefruchtung?

Die Befruchtung der Eizelle erfolgt in mehreren Schritten (Abbildung 4). Lockstoffe, die von der Eizelle oder den umgebenden Zellen (*Cumuluszellen*) ausgeschüttet werden, weisen den Spermien den Weg zur Eizelle (*Chemotaxis*). Nachdem die Spermien den Ring von Cumuluszellen passiert haben, lagern sie sich an der gallertartigen Eihülle an und schütten einen Enzym-Cocktail aus (*Akrosomreaktion*), der die Eihülle verdaut. Gleichzeitig werden die Spermien beweglicher (*Hyperaktivität*), was ihnen hilft, die Eihülle zu durchdringen und mit der Eizelle zu verschmelzen.

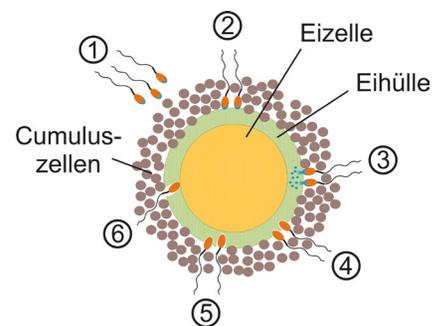


Abbildung 4: Stadien der Eibefruchtung. (1) Lockstoffe weisen den Spermien den Weg zur Eizelle. (2) Die Spermien lagern sich an der gallertartigen Eihülle an und (3) schütten einen Enzym-Cocktail aus, der die Eihülle abbaut. (4) Gleichzeitig zeigen die Spermien eine stark erhöhte Beweglichkeit (*Hyperaktivität*), die es ihnen ermöglicht, die Eihülle zu durchdringen (5). Schlussendlich verschmelzen Spermium und Eizelle miteinander (6).

Alle diese Schritte sind begleitet von Änderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Die schnelle Ca^{2+} -Reaktion der Spermien auf Progesteron ist wahrscheinlich wichtig für die Befruchtung der Eizelle: Die Cumuluszellen schütten große Progesteronmengen aus, die in Spermien die Akrosomreaktion auslösen. Dieser Schritt ist entscheidend, die Eihülle zu durchdringen. Neben Progesteron gibt es allerdings weitere Substanzen, die die Akrosomreaktion triggern. Eine weitere Funktion von Progesteron bei der Eibefruchtung wird diskutiert: Es gibt Hinweise darauf, dass Spermien von Progesteron angezogen werden und so den Weg zur Eizelle finden, d.h. Progesteron dient der Eizelle als Lockstoff.

Die Rezeptoren und der Signalweg für die schnelle, nicht-genomische Wirkung von Progesteron: Aktenzeichen XY ungelöst

Obwohl bereits seit mehr als zwanzig Jahren bekannt ist, dass Progesteron in Spermien eine Ca^{2+} -Antwort und die Akrosomreaktion auslöst, sind die Progesteronrezeptoren und der zelluläre Signalweg nach wie vor unbekannt. Es wird jedoch vermutet, dass Progesteron an Rezeptoren in der Plasmamembran bindet. Auch in anderen Zelltypen, wie z.B. Leberzellen, bestimmten Neuronen und Fischeiern, beobachtet man schnelle Progesteron-induzierte Ca^{2+} -Signale. Vor einigen Jahren wurden in Leberzellen von Schweinen und in Ovarien von Fischen Proteine identifiziert, die als Kandidaten für membranständige Progesteronrezeptoren vorgeschlagen wurden – *membrane progesterin receptors* (mPR α , mPR β und mPR γ) und *progesteron receptor membrane components* (PGRMC1 und 2). Inzwischen gibt es eine an-

sehnliche Literatur darüber. Ob die mPR- bzw. PGRMC-Proteine tatsächlich als Progesteronrezeptoren fungieren, ist allerdings zweifelhaft. Wir konnten PGRMC-Proteine in menschlichen Spermien nachweisen. Abbildung 5 zeigt Färbungen mit Antikörpern, die das PGRMC1- bzw. PGRMC2-Protein erkennen.

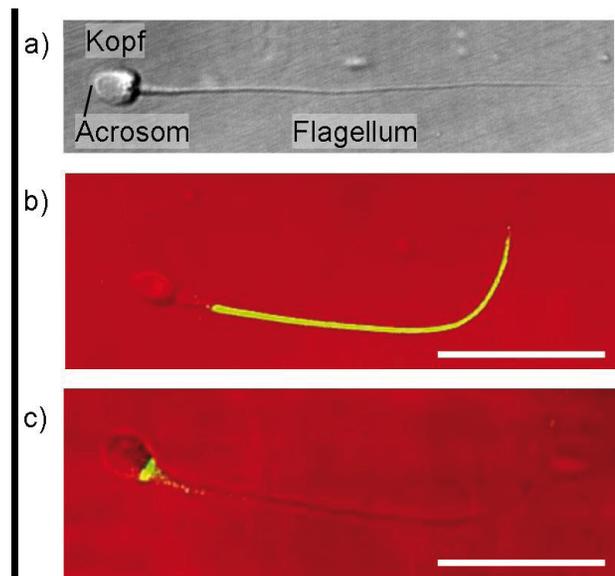


Abbildung 5: Lokalisation von PGRMC1- und PGRMC2-Proteinen in Spermien.

a) Mikroskopisches Bild eines einzelnen menschlichen Spermiums. Das Spermium lässt sich grob in Kopf und Flagellum unterteilen. Der Kopf enthält das Acrosom. b) PGRMC1-Proteine befinden sich ausschließlich im Flagellum von menschlichen Spermien. Die PGRMC1-Proteine wurden mit einem grün fluoreszierenden Antikörper nachgewiesen, der das PGRMC1-Protein erkennt. c) PGRMC2-Proteine findet man am Übergang zwischen Kopf und Flagellum. Detektiert wurden die PGRMC2-Proteine ebenfalls mit einem grün fluoreszierenden Antikörper. Die Größenskala in den Bildern (weißer Strich) entspricht 20 μm .

Während PGRMC1 ausschließlich im Flagellum lokalisiert ist, findet sich PGRMC2 in einer Region direkt am Übergang zwischen Kopf und Flagellum. Wir haben die vermutete Progesteronbindestelle der PGRMC-Proteine in großen

Mengen in Bakterien hergestellt und untersucht, ob diese Proteindomäne Progesteron bindet. Überraschenderweise konnten wir keine Progesteronbindung beobachten.

Das deutet daraufhin, dass PGRMC-Proteine keine Progesteronrezeptoren darstellen. Die Funktion der PGRMC-Proteine in Spermien bleibt deshalb völlig unklar. Unser Ziel ist, die „wirklichen“ Progesteronrezeptoren in Spermien zu identifizieren und ihre Funktion aufzuklären.

caged-Progesteron: Ein neues Werkzeug zur Aufklärung des Signalweges von Progesteron.

Die schnelle Progesteronwirkung auf Spermien ist nicht einfach zu untersuchen. Nach der Stimulation mit Progesteron steigt das Ca^{2+} -Signal mit einer Latenzzeit von nur wenigen Millisekunden an (Abbildung 6).

Um den Zeitverlauf dieser sehr schnellen Signale genau verfolgen zu können, verwenden wir die sogenannte *Stopped-Flow*-Mess-technik (siehe Methoden-Box). Spermien werden in wenigen Millisekunden mit Progesteron gemischt, in eine Küvette überführt, in der – mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffs – das Ca^{2+} -Signal registriert wird.

Zwischen der Progesteronstimulation und der Überführung der Spermien in die Küvette liegen ca. 30 ms - gerade schnell genug, um das Ca^{2+} -Signal vollständig aufzuzeichnen.

Um die Progesteronsignale in Spermien, aber auch in anderen Zellen, genauer untersuchen zu können, haben wir ein sogenanntes *caged*-Progesteron entwickelt. Dazu wurde an das Progesteron eine chemische Schutzgruppe, ein sogenannter „*cage*“ (Käfig) angefügt (Ab-

bildung 7). Die Spermien reagieren auf das *caged*-Progesteron etwa 500-1000fach weniger empfindlich als auf normales Progesteron. Kurz gesagt: Das *caged*-Progesteron ist biologisch inaktiv, für die Spermien „unsichtbar“.

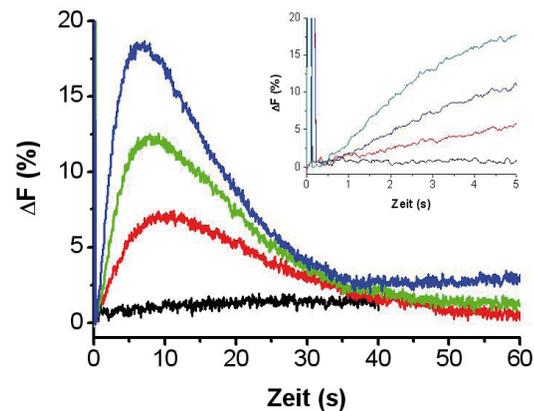


Abbildung 6: Ca^{2+} -Signale in menschlichen Spermien nach photolytischer Freisetzung von Progesteron aus *caged*-Progesteron. Menschliche Spermien ($2 \cdot 10^7$ Spermien/ml) wurden in einer *Stopped-Flow*-Apparatur (Methoden-Box) mit *caged*-Progesteron ($7,5 \mu\text{M}$) gemischt. In der Küvette wurden UV-Blitze mit einer Intensität von 100% (blau), 50% (grün) bzw. 25% (rot) appliziert und so unterschiedliche Progesteronmengen freigesetzt (schwarz = kein UV-Blitz). Änderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration wurden mit einem Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoff verfolgt ($F = \text{Fluoreszenz}$). Die UV-Blitze erfolgten zum Zeitpunkt $t = 0$. Das Insert zeigt die ersten 5 Sekunden nach der Progesteronfreisetzung. Die Blitzartefakte auf dem Fluoreszenzsignal zeigen den genauen Zeitpunkt der Freisetzung.

Mit einem Trick lässt sich aus dem „unsichtbaren“ *caged*-Progesteron aktives Progesteron freisetzen. Ultraviolettes (UV) Licht spaltet die Bindung (*Photolyse*) zwischen *cage* und Progesteron (Abbildung 7). Die Photolyse erfolgt innerhalb weniger Mikrosekunden. Abbildung 6 zeigt ein Ca^{2+} -Signal in Spermien, ausgelöst durch die photolytische Freisetzung von Progesteron.

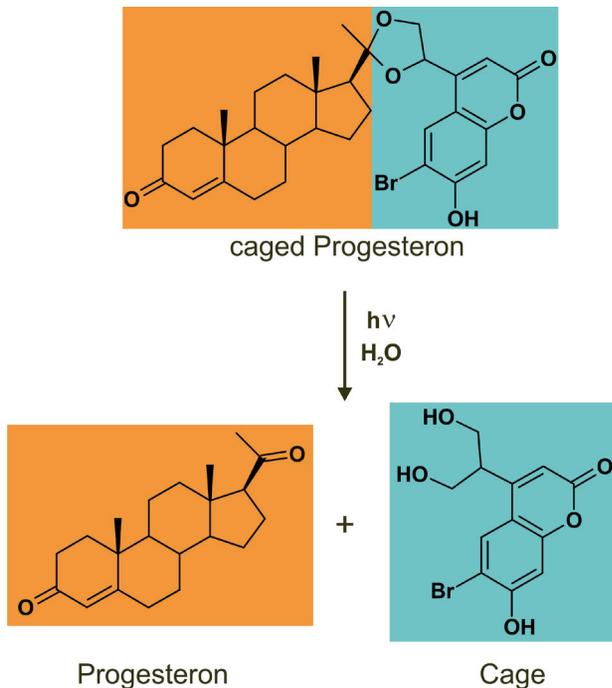


Abbildung 7: caged-Progesteron. An das Progesteron wurde eine chemische Schutzgruppe (*cage*) angefügt. Das *caged*-Progesteron-Molekül ist biologisch inaktiv. Per UV-Licht ($h\nu$) kann die Verbindung zwischen Progesteron und dem *cage* gespalten werden – das biologisch aktive Progesteron wird freigesetzt.

Dazu wurden Spermien in der *Stopped-Flow*-Apparatur zunächst mit dem *caged*-Progesteron gemischt und in die Küvette überführt. Dann wurde die Probe mit einem UV-Blitz bestrahlt und so das Progesteron freigesetzt. Je höher die Intensität des UV-Blitzes ist, desto mehr Progesteron wird freigesetzt und desto größer werden die Ca^{2+} -Signale. Da die Progesteronfreisetzung innerhalb weniger Mikrosekunden erfolgt, lässt sich die Latenzzeit der Ca^{2+} -Signal sehr gut bestimmen. Dieses Experiment zeigt, dass die ultraschnelle Freisetzung von Progesteron aus *caged*-Progesteron sich gut dafür eignet, schnelle, nicht-genomische Progesteronwirkungen zu untersuchen. Wir möchten dieses neue Werkzeug einsetzen, um

den Signalweg von Progesteron aufzuklären. Das *caged*-Progesteron eignet sich auch hervorragend für Verhaltensexperimente mit Spermien. Es wird vermutet, dass Progesteron als Lockstoff für Spermien dient. Diese Hypothese möchten wir überprüfen. Das Schwimmverhalten von Spermien lässt sich in einer Messkammer unter dem Mikroskop beobachten. Wenn die Spermien in einer Lösung schwimmen, die *caged*-Progesteron enthält, kann durch einen UV-Blitz in der Messkammer lokal begrenzt Progesteron freigesetzt werden; so kann man eine künstliche Lockstoffquelle erzeugen, d.h. eine Eizelle simulieren. Sollten die Spermien tatsächlich von Progesteron angelockt werden, müssten die Spermien zu der Stelle schwimmen, an der Progesteron freigesetzt wurde. Soweit die Theorie. Die Auswertung von Verhaltensexperimenten mit Spermien ist allerdings kompliziert, da immer nur ein kleiner Teil ($\sim 10\%$) einer Spermienpopulation auf Lockstoffe reagiert. Wir entwickeln zurzeit ein computerbasiertes Analyseverfahren, das uns helfen soll, das Schwimmverhalten von menschlichen Spermien zuverlässig und quantitativ zu analysieren. Das von uns entwickelte *caged*-Progesteron erlaubt es auch in anderen Zellen und sogar am intakten Gewebe, Progesteron-induzierte Ca^{2+} -Signale aufzunehmen. Experimente mit Zellverbänden, Gewebeschnitten, oder ganzen Geweben werden oft unter dem Mikroskop in speziellen Messkammern durchgeführt, die lediglich eine langsame Umspülung des Präparates mit Progesteronlösungen erlauben. Unter solchen Bedingungen können schnelle Progesteronwirkungen nicht registriert werden. Man kann nun solche Prä-

parate mit Lösungen perfundieren, die das *caged*-Progesteron enthalten. Lokal begrenzt und schnell kann das Progesteron mit UV-Blitzen freigesetzt und die Antwort der Zellen verfolgt werden.

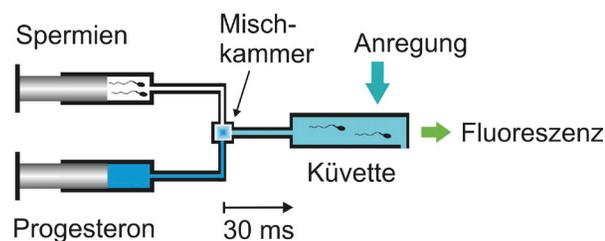
Die Wirkung von Progesteron auf Spermien: Ein spannendes Forschungsprojekt

Der nicht-genomische Signalweg von Progesteron wird intensiv erforscht. Mit Hilfe

von molekularbiologischen, biochemischen und biophysikalischen Methoden möchten wir die Progesteronrezeptoren in Spermien identifizieren und den zellulären Signalweg aufklären. Letztendlich erhoffen wir uns davon, die Frage nach der physiologischen Bedeutung von Progesteron in Spermien zweifelsfrei beantworten zu können.

Die *Stopped-Flow*-Methode

Die *Stopped-Flow*-Methode ermöglicht, die Vorgänge im Inneren der Spermien nach einer Progesteronstimulation zu verfolgen. Ein großer Vorteil ist dabei die sehr hohe Zeitauflösung. Das System besteht aus mehreren Spritzen, einer Mischkammer und einer Küvette. Eine der Spritzen enthält eine Spermiesuspension mit etwa 2×10^7 Spermien pro Milliliter. In der anderen Spritze befindet sich eine Progesteronlösung. Durch einen synchronisierten, simultanen Druck auf die Stempel der beiden Spritzen werden die Spermiesuspension und die Progesteronlösung durch ein Röhrensystem in eine Mischkammer befördert. In der Mischkammer wird die Spermiesuspension mit der Progesteronlösung vermischt. Durch den Vortrieb der Spritzenstempel wird das Spermien-Progesterongemisch dann in eine Küvette befördert. Sobald die Küvette gefüllt ist, wird der Fluß (*Flow*) der Lösungen gestoppt. Daher der Name „*Stopped-Flow*“. Die Spermien gelangen innerhalb von 30 ms von der Mischkammer in die Küvette. Hier kann dann mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen z.B. die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration in den Spermien verfolgt werden. Dazu werden die Spermien vor dem Experiment mit einem fluoreszierenden Ca^{2+} -Indikatorfarbstoff beladen. In der Küvette wird der Farbstoff in den Spermien zur Fluoreszenz angeregt. Die Intensität des ausgesendeten Fluoreszenzlichtes ist dann proportional zur intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Zudem kann die Küvette mit UV-Licht bestrahlt werden, um z.B. *caged*-Progesteron in der Küvette freizusetzen.



Methoden-Box: Die *Stopped-Flow*-Methode

Literatur

[1] Kilic F, Kashikar ND, Schmidt R, Alvarez L, Dai L, Weyand I, Wiesner B, Goodwin N, Hagen V, Kaupp UB, "Caged progesterone: a new tool for studying rapid nongenomic actions of progesterone." *J. Am. Chem. Soc.* **131** (11), 4027-4030 (2009).

[2] Kaupp UB, Kashikar ND, Weyand I, "Mechanisms of sperm chemotaxis." *Annu. Rev. Physiol.* **70**, 93-117 (2008).

[3] Publicover SJ, Giojalas LC, Teves ME, de Oliveira GS, Garcia AA, Barratt CL, Harper CV, "Ca²⁺ signalling in the control of motility and guidance in mammalian sperm." *Front. Biosci.* **13**, 5623-5637 (2008).

[4] Gellersen B, Fernandes MS, Brosens JJ, "Non-genomic progesterone actions in female reproduction." *Hum. Reprod. Update* **15** (1), 119-138 (2009).

Ein außergewöhnlicher Ionenkanal kontrolliert das Schwimmverhalten von Seeigelspermien

ASTRID LOOGEN UND REINHARD SEIFERT
Molekulare Neurosensorik

Ein neues Lebewesen entsteht, wenn weibliche und männliche Keimzellen miteinander verschmelzen. Die Wahrscheinlichkeit, dass Eizelle und Spermium zufällig aufeinander treffen, ist allerdings gering. Die Eizelle unterstützt die Suche der Spermien, indem sie spezifische Lockstoffe ausschüttet. Die Lockstoffe bilden einen chemischen Gradienten um die Eizelle. Die Spermien orientieren sich an dem Gradienten und finden so ihr Ziel. Die gerichtete Bewegung hin zur Quelle eines chemischen Lockstoffes nennt man *Chemotaxis*.

Als Modell zur Erforschung der *Chemotaxis* dienen seit fast 100 Jahren die Spermien und Eizellen von Seeigeln (Abbildung 1). Seeigel sind marine Wirbellose, die extern befruchten, indem sie ihre Eizellen und Spermien ins Meer entlassen. Der Lockstoff der Seeigelart *Arbacia punctulata* ist ein kurzes Peptid aus 14 Aminosäuren, das *Resact* genannt wird. Stimuliert man *A. punctulata*-Spermien mit *Resact*, ändert sich deren Schwimmverhalten und sie schwimmen auf die Eizelle zu. Wie schwimmen Spermien?

Das Schwimmverhalten von Seeigelspermien

Im Meer schwimmen Seeigelspermien auf spiralförmigen Bahnen. Im Labor jedoch lässt sich

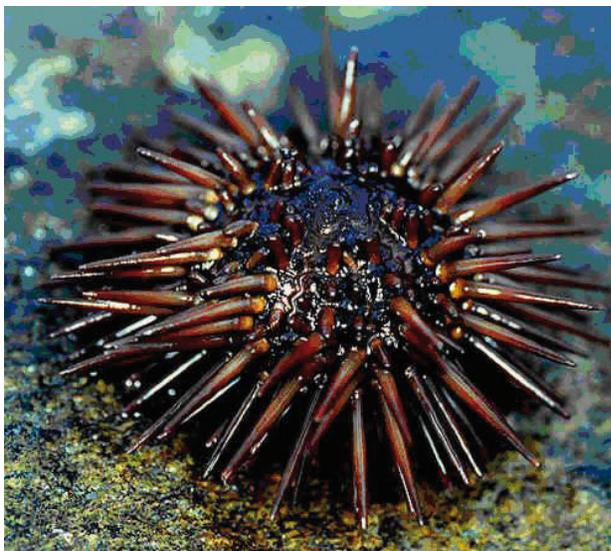


Abbildung 1: Ein Seeigel der Art *Arbacia punctulata*.

das Schwimmverhalten leichter unter dem Mikroskop verfolgen, wenn sich die Spermien in einer flachen Beobachtungskammer befinden. Dort schwimmen sie auf kreisförmigen Bahnen an der Grenzfläche zwischen Glas und Wasser. Erzeugt man einen Lockstoffgradienten, ändert sich das Schwimmverhalten der Spermien: Sie bewegen sich entlang einer Bahn aus driftenden Kreisen auf die Lockstoffquelle zu (Abbildung 2). Wie ist dieses Schwimmverhalten zu erklären?

Die Krümmung der Schwimmbahn wird durch das Schlagmuster des Spermischwanzes, dem sogenannten Flagellum, bestimmt. Das Schlagmuster ist leicht asymmetrisch, so dass die Spermien im Kreis schwimmen. Je stärker die Asymmetrie des Flagellenschlags ausgeprägt ist, desto stärker ist die Schwimmbahn

gekrümmt. Ist die Schwimmbahn kurzfristig stark gekrümmt, sprechen wir von einem „turn“. Bei weniger starker Krümmung schwimmen die Spermien geradeaus, eine solche Phase bezeichnen wir als „run“. Dieses Schwimmverhalten ist stark an Änderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration gekoppelt: Steigt die Ca^{2+} -Konzentration im Flagellum an, beobachtet man einen „turn“, sinkt sie ab, kommt es zu einem „run“.

Da sich das Spermium im Gradienten auf kreis- oder spiralförmigen Bahnen bewegt, ist es periodischen Änderungen der Lockstoffkonzentration ausgesetzt: es wird periodisch mit Lockstoff stimuliert. Auf jede Stimulation folgt mit einer charakteristischen Verzögerung ein kurzfristiger Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Das Spermium reagiert mit einem „turn“, gefolgt von einem „run“ in der anschließenden Phase, in der die Ca^{2+} -Konzentration wieder absinkt. Die driftende Kreisbahn im Lockstoffgradienten kann man also durch eine Abfolge von zwei Schlagmustern erklären, die erst einen „turn“ und dann einen „run“ auslösen (Abbildung 2).

Spermien von *A. punctulata* können einzelne Moleküle detektieren

Bei ihrer Suche nach der Eizelle sind *A. punctulata*-Spermien äußerst empfindlich: Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass Spermien sogar die Bindung eines einzelnen Lockstoffmoleküls detektieren und mit einem Ca^{2+} -Signal reagieren können. Diese Empfindlichkeit ist sehr bemerkenswert und bisher nur von Sehzellen bekannt. Sehzellen können einzelne Photonen erkennen und in eine zelluläre Antwort umwandeln.

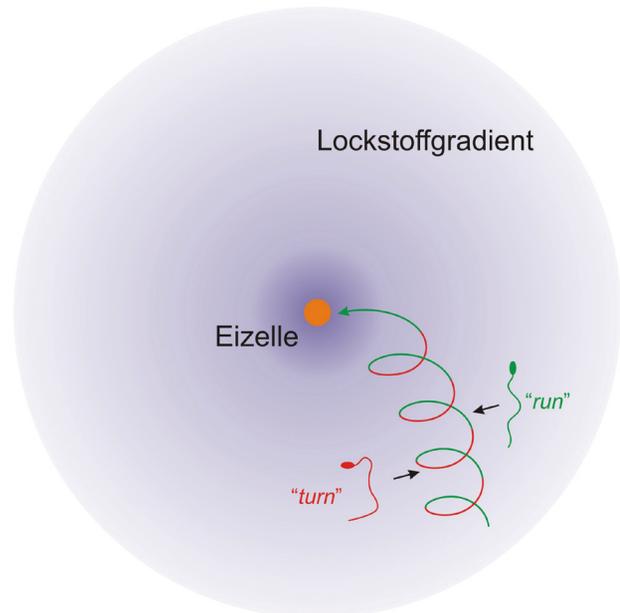


Abbildung 2: Seeigelspermien bewegen sich auf einer Bahn driftender Kreise auf die Eizelle zu. Die Eizelle setzt den Lockstoff frei. Dieser bildet einen Gradienten um die Eizelle aus. Das Spermium nimmt den Lockstoff wahr und bewegt sich entlang einer Bahn aus driftenden Kreisen auf die Eizelle zu. Dabei schlägt das Flagellum abwechselnd asymmetrisch (rot) und symmetrisch (grün). Eine Abfolge solcher „turns“ (rot) und „runs“ (grün) bringt das Spermium zu seinem Ziel – der Eizelle.

Was passiert nach der Lockstoffstimulation?

Der erste Schritt in der Signalkette, die das Schwimmverhalten der Spermien steuert, ist die Bindung des Lockstoffs an einen Rezeptor auf der Oberfläche des Flagellums. Bei diesem Rezeptor handelt es sich um eine Guanylylzyklase, die aus GTP den intrazellulären Botenstoff cGMP bildet. Die nachfolgenden physiologischen Vorgänge konnten erst kürzlich durch schnelle Mischtechniken aufgeklärt werden. In einer *Stopped-Flow*-Apparatur (Abbildung 3) werden Spermien und Lockstoff schnell gemischt, so dass alle Spermien zu exakt demselben Zeitpunkt stimuliert werden.

Gleichzeitig ist es möglich, mithilfe von Indikatoren wichtige physiologische Prozesse

optisch zu verfolgen. So wurden insbesondere der Verlauf des Membranpotenzials sowie der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration unmittelbar nach der Lockstoffstimulation verfolgt.

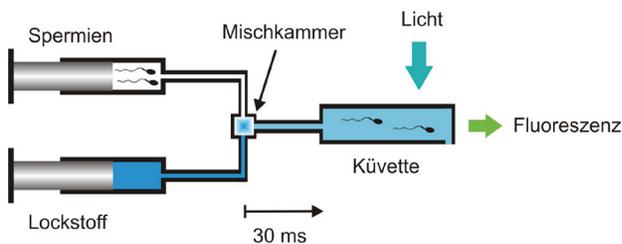


Abbildung 3: Schematischer Aufbau der Stopped-Flow-Apparatur. In je einer Spritze befinden sich Spermien und Lockstoff. Die Spermien sind mit Indikatormolekülen markiert, die entweder das Membranpotenzial der Zellen oder die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration über einen Fluoreszenzprozess anzeigen.

Wir konnten zeigen, dass eine sehr schnelle Änderung des Membranpotenzials allen anderen Prozessen vorausgeht: Die Spermien besitzen im unstimulierten Zustand ein Membranpotenzial, das etwa bei -43 mV liegt. Durch die Lockstoffstimulation kommt es kurzfristig zu einer starken Hyperpolarisation, d.h. das Membranpotenzial wird negativer. Je nach Lockstoffkonzentration nimmt das Membranpotenzial Werte von -45 mV bis ca. -100 mV an (Abbildung 4, oben). Anschließend wird das Membranpotenzial wieder positiver, man spricht von einer Depolarisation. Genau zu diesem Zeitpunkt kommt es zu einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (Abbildung 4, unten, rote Kurve). Das Schlagmuster des Flagellums wird asymmetrischer und das Spermium ändert seine Schwimmrichtung. Eine Hyperpolarisation der Zelle als unmittelbare Antwort auf die Lockstoffstimulation ist ungewöhnlich. Fast alle Zellen reagieren auf

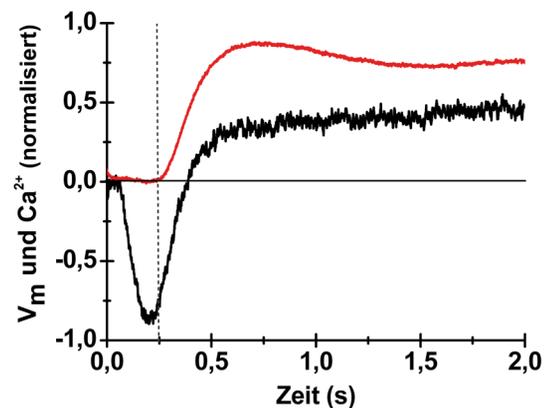
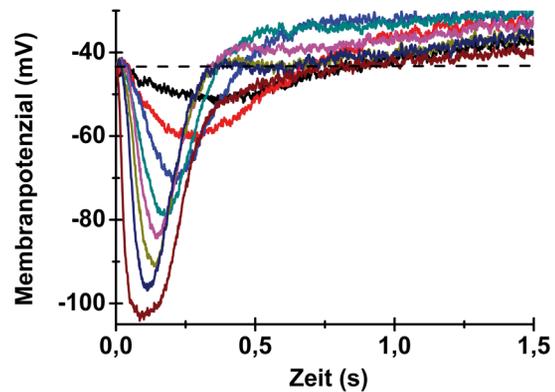


Abbildung 4: Änderungen des Membranpotenzials und der Calcium-Konzentration nach Lockstoffstimulation. Oben: Spermien wurden zum Zeitpunkt $t=0$ mit unterschiedlichen Konzentrationen *Resact* stimuliert. Unten: Vergleich des Zeitverlaufs der Änderungen des Membranpotenzials (schwarz) und der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (rot).

einen Reiz mit einer Depolarisation. Ionenaustauschversuche haben gezeigt, dass die Hyperpolarisation durch die Aktivierung eines K^+ -selektiven Ionenkanals hervorgerufen wird. Die Tatsache, dass dieser Ionenkanal auch aktiviert werden kann, indem man den Rezeptor umgeht und dafür direkt den Botenstoff cGMP anbietet, führte schließlich zu der Hypothese, dass ein cGMP-gesteuerter Kaliumkanal für die Hyperpolarisation verantwortlich ist.

CNGK – ein außergewöhnlicher Ionenkanal

Es ist uns gelungen, die DNA, die die Erbinformation für den cGMP-gesteuerten Ionenkanal trägt, aus Hodengewebe von *A. punctulata* zu isolieren. Der Ionenkanal wurde von uns CNGK-Kanal – (K^+ -selective *cyclic nucleotide-gated channel*) – genannt. Betrachtet man die aus der DNA abgeleitete Aminosäuresequenz, so wird deutlich, dass der CNGK-Kanal sich von allen bekannten Ionenkanälen unterscheidet und eine völlig neue Ionenkanalfamilie bildet. Durch seine Bindestelle für zyklische

Nukleotide ähnelt er am meisten den zyklisch Nukleotid-gesteuerten Ionenkanälen (*cyclic nucleotide-gated channel*, CNG-Kanal). CNG-Kanäle setzen sich aus vier Untereinheiten zusammen. Jede Untereinheit besteht aus sechs Transmembransegmenten (S1-S6), einer Porenregion zwischen S5 und S6 und einer Bindestelle für zyklische Nukleotide (Abbildung 5, oben). Der CNGK-Kanal zeigt jedoch eine völlig neue Struktur: Er besitzt vier ähnliche Kanaldomänen in einer langen Polypeptidkette (Abbildung 5, unten). Jede dieser Kanaldomänen

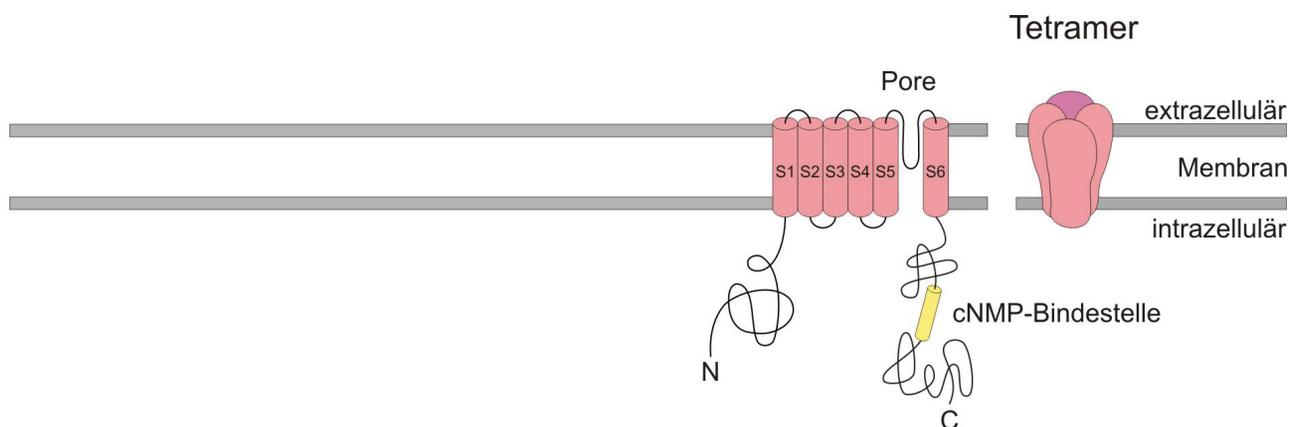
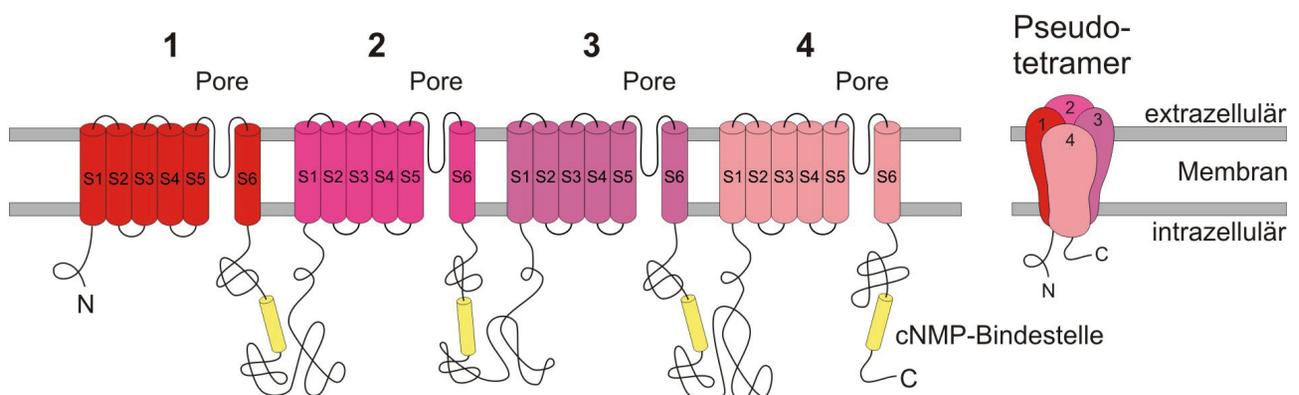
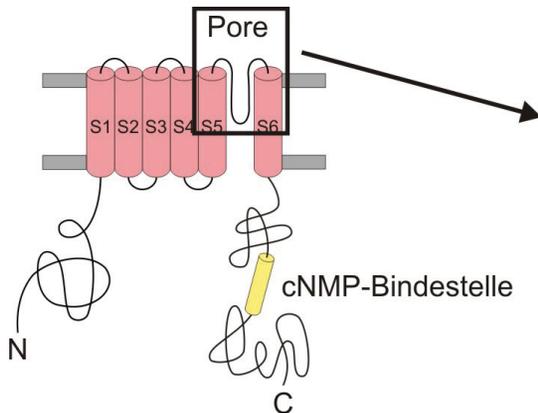
CNG-KanalCNGK-Kanal

Abbildung 5: Vergleich von CNG- und CNGK-Kanälen. Die Abbildung vergleicht den Aufbau von CNG- und CNGK-Kanälen. Während sich bei CNG-Kanälen (oben) vier einzelne Untereinheiten zu einem Tetramer zusammenschließen und so die Pore ausbilden, besitzt der CNGK-Kanal (unten) alle vier Kanaldomänen in einer Polypeptidkette; die vier Kanaldomänen bilden ein Pseudotetramer aus. Mit S1-S6 sind die Transmembransegmente gekennzeichnet. Die Bindestelle für zyklische Nukleotide (cNMP-Bindestelle) ist als gelbe Tonne dargestellt.



CNGK 1	243-	YWSVATATST GYGD ISAVN	-	261
CNGK 2	792-	YWAAATMTST GYGD ISAHS	-	810
CNGK 3	1343-	YWASATGASV GYGD IHAKN	-	1361
CNGK 4	1977-	YWAVATLTST GYGD IHAYS	-	1995
KcsA	68-	WWSVETATTV GYGD LYPVT	-	85
KAT1	252-	YWSITTLTTT GYGD FHAEN	-	270
Shaker	434-	WWAVVTMTTV GYGD MTPVG	-	452
rCNGA1	345-	YWSTLTLTTI G--ET PPPV	-	361

Abbildung 6: Die Porenregion des CNGK-Kanals. Die Abbildung vergleicht die Aminosäuresequenzen in den Porenregionen der vier CNGK-Kanaldomänen (blau) mit denen von Kaliumkanälen (grün) und CNG-Kanälen (orange). Für die K⁺-selektiven Kanäle ist das GYGD-Sequenzmotiv in Rot hervorgehoben. Im CNG-Kanal fehlt dieses Motiv. Die Zahlen vor bzw. hinter dem Sequenzabschnitt geben die Position innerhalb der Gesamtsequenz an.

besitzt den gleichen Aufbau wie eine CNG-Kanaluntereinheit. Wir nehmen an, dass sich die vier Kanaldomänen zu einem sogenannten Pseudotetramer zusammenlagern (Abbildung 5). Eine solche Architektur ist bisher nur von Natrium- und Calciumkanälen bekannt. Wir haben die CNGK-Aminosäuresequenz auf weitere Sequenzmotive untersucht, die vielleicht etwas über die Eigenschaften des Ionenkanals verraten. Bestimmte Sequenzmotive sind im Verlauf der Evolution erhalten geblieben, weil sie für die Funktion und die Struktur wichtig sind. Ein Beispiel für ein hoch konserviertes Sequenzmotiv ist die Porenregion von Ionenkanälen. Durch viele Studien, die sich mit der Leitfähigkeit von Ionenkanälen beschäftigt haben, wissen wir gut, wo die Pore lokalisiert ist. Dabei stellten wir fest, dass alle vier Porenregionen des CNGK-Kanals das typische Sequenzmotiv der Kaliumkanäle besitzen (Abbildung 6). Sind Ionenkanäle selektiv für K⁺-Ionen, besitzen sie in dieser Region die vier Aminosäuren Glyzin, Tyrosin, Glyzin und Asparaginsäure – im Einbuchstabenkode der Aminosäuren GYGD abgekürzt. Dagegen

stellen die CNG-Kanäle aus Wirbeltieren nicht-selektive Kationenkanäle dar, d.h. sie können zwischen verschiedenen Kationen nicht unterscheiden und leiten sie gleichermaßen gut. Diesen klassischen CNG-Kanälen fehlt das GYGD-Sequenzmotiv der K⁺-selektiven Ionenkanäle. Diese Sequenzanalyse zeigt, dass sich der CNGK-Kanal nicht nur durch seine Struktur, sondern auch durch seine Ionenselektivität von den klassischen CNG-Kanälen unterscheidet.

Die Eigenschaften des CNGK-Kanals haben wir mit biochemischen und elektrophysiologischen Methoden untersucht. Zunächst wurden Antikörper hergestellt, die den CNGK-Kanal spezifisch erkennen. Diese Antikörper erkennen durch eine spezifische Färbung den CNGK-Kanal im Flagellum der Spermien – also dort, wo die chemotaktische Signalumwandlung stattfindet (Abbildung 7).

Um die elektrischen Eigenschaften des CNGK-Kanals zu untersuchen, wurde das Gen in Wirtszellen eingeschleust. Anschließend wurden die CNGK-Ionenströme dieser Zellen mit Mikroelektroden abgeleitet. In Zellen, die den

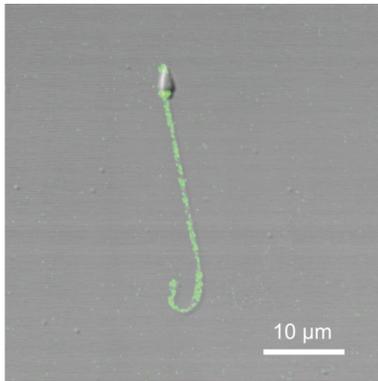


Abbildung 7: Der CNGK-Kanal ist im Flagellum von *A. punctulata*-Spermien lokalisiert. Durch einen spezifischen Antikörper kann der CNGK-Kanal im Flagellum des Spermiums sichtbar gemacht werden. Der weiße Balken in der Abbildung entspricht 10 Mikrometer – 10×10^{-6} Meter.

CNGK-Kanal besitzen, beobachtet man in Anwesenheit des Botenstoffs cGMP Ströme mit einem ganz charakteristischen Spannungsverlauf (Abbildung 8).

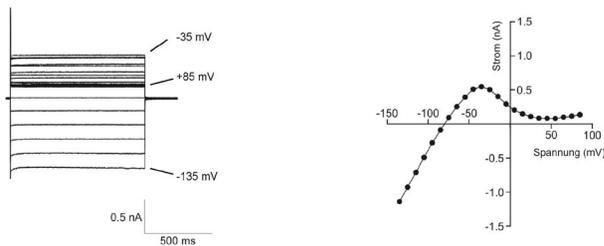


Abbildung 8: Elektrophysiologische Charakterisierung des CNGK-Kanals. Links: Ganzzellströme einer Wirtszelle, die CNGK-Kanäle zur Expression gebracht hat. Die Kanäle wurden durch cGMP ($100 \mu\text{M}$) aktiviert. Rechts: Die Strom-Spannungskennlinie zeigt das für Kaliumkanäle typische Umkehrpotenzial von -80 mV .

Die Strom-Spannungskennlinie kreuzt die Abszisse bei ca. -80 mV . Dieser Wert deutet an, dass der CNGK-Kanal hauptsächlich K^+ -Ionen leitet; er ist also tatsächlich K^+ -selektiv. Den größten CNGK-Strom findet man bei Spannungen von ca. -35 mV .

Die Aktivierung durch cGMP oder cAMP wurde

an kleinen Membranflecken in der sogenannten „inside out“-Konfiguration untersucht. Bei dieser Messmethode lässt sich die Innenseite der Membran, wo sich die Bindestellen für zyklische Nukleotide befinden, mit unterschiedlichen Ligandenkonzentrationen umspülen. Der CNGK-Strom ist ein gutes Maß für die Aktivierung des Ionenkanals. Vergleicht man die Ströme bei verschiedenen Ligandenkonzentrationen, erhält man die Dosis-Wirkungsbeziehung für den jeweiligen Liganden. Der CNGK-Kanal reagiert sehr empfindlich auf cGMP: Schon bei Konzentrationen von 25 nM ist der CNGK-Kanal halbmaximal aktiviert (Abbildung 9, ●). Man nennt diese Konzentration auch $K_{1/2}$ -Wert. Im Vergleich zu cAMP benötigt man eine etwa 100fach größere cAMP-Konzentration (ca. $2 \mu\text{M}$), um eine ebenso gute Aktivierung zu erzielen.

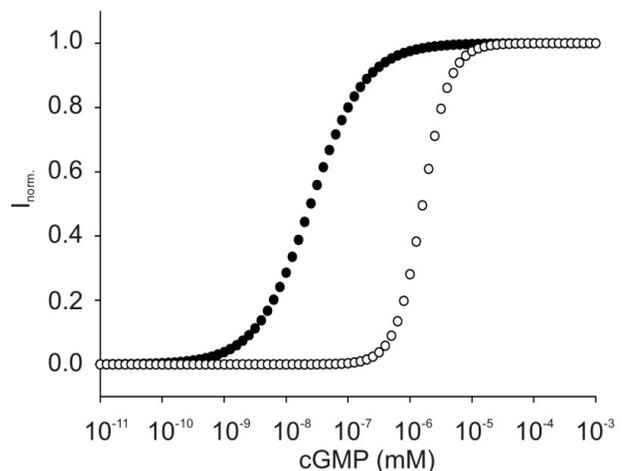


Abbildung 9: Ligandenabhängige Aktivierung des CNGK- und des CNGA2-Kanals. Aktivierung des CNGK-Kanals (●) sowie des CNGA2-Kanals (○) durch cGMP. Die Steigung der Kurve sagt für CNGK nicht-kooperative Aktivierung voraus.

Vergleicht man die Konzentrationsabhängigkeit der Aktivierung des CNGK-Kanals (Abbil-

dung 9, ●) mit der von klassischen CNG-Kanälen (Abbildung 9, o), so fallen zwei wesentliche Unterschiede auf: Zum einen ist der CNGK-Kanal ca. 100-1000fach empfindlicher für cGMP als klassische CNG-Kanäle, zum anderen zeigt die Aktivierungskurve auch eine weniger starke Steigung (Abbildung 9). Aus der Steigung dieser Kurve kann man einiges über den Aktivierungsmechanismus der Kanäle erfahren. So ist für die klassischen CNG-Kanäle aus dieser Steigung vorhergesagt worden, dass mindestens zwei Moleküle cGMP an den Kanal binden müssen, um ihn signifikant zu öffnen. Dies konnte kürzlich durch aufwändige biophysikalische Untersuchungen bestätigt werden. Man bezeichnet den Aktivierungsmechanismus der CNG-Kanäle als kooperativ. Dieselbe Analyse charakterisiert die Aktivierung des CNGK-Kanals als nicht-kooperativ. Anders ausgedrückt: Es könnte sein, dass nur ein cGMP-Molekül notwendig ist, um den CNGK-Kanal zu öffnen. Um diese Hypothese durch weitere Experimente zu bestätigen, haben wir die vier Liganbindestellen des Kanals näher untersucht. Bindestellen für zyklische Nukleotide sind schon lange von großem wissenschaftlichen Interesse, und Kontakte zwischen Protein und Ligand hat man in anderen Proteinen bereits aufgeklärt. Eine starke Wechselwirkung zwischen der negativ geladenen Phosphatgruppe des zyklischen Nukleotids und der positiv geladenen Seitengruppe eines Arginins ist besonders wichtig (Abbildung 10, links). Dieses Arginin ist in allen bisher gefundenen Bindestellen für zyklische Nukleotide vorhanden – so auch in allen vier Bindestellen des CNGK-Kanals. Tauscht man dieses charakteristische Arginin gegen ein Glutamin aus, so verringert

sich die cAMP- bzw. cGMP-Empfindlichkeit der Bindestelle um das 100-1000fache. Wir haben deshalb im CNGK-Kanal jedes der vier Arginine (R) gegen Glutamin (Q) ausgetauscht. Zusätzlich wurde auch jede mögliche Kombination von RQ-Mutanten untersucht. Wir wollten die Frage beantworten, welche der vier Bindestellen für die hohe cGMP-Empfindlichkeit verantwortlich ist.

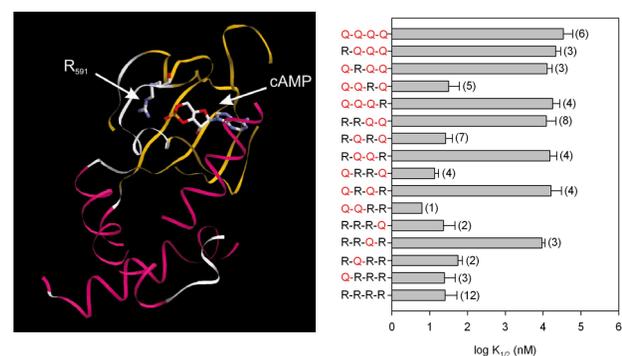


Abbildung 10: Untersuchung der CNGK-Bindestellen für zyklische Nukleotide. Links: *RasMol*-Darstellung der Wechselwirkung des cAMP mit einem wichtigen Arginin in der zyklisch Nukleotid-Bindestelle des HCN2-Kanals der Maus. Rechts: Effekt von einzelnen oder mehreren RQ-Aminosäureaustauschen auf die Aktivierungseigenschaften ($K_{1/2}$) des CNGK-Kanals.

Die Antwort war viel einfacher als erwartet und sie war klar. In allen CNGK-Kanälen mit einer intakten Bindestelle in der dritten Kanal-domäne bleibt die hohe Empfindlichkeit des Wildtypkanals erhalten (Abbildung 10, rechts). Der RQ124-Kanal beispielsweise, bei dem die erste, zweite und vierte Bindestelle inaktiviert wurden, besitzt die hohe Empfindlichkeit des Wildtyps, während in allen Kanalkonstrukten, die eine gestörte dritte Bindestelle besitzen, die Empfindlichkeit für cGMP 500mal niedriger ist. Es macht keinen Unterschied, ob die dritte Bindestelle alleine, wie in RQ3, oder alle

Bindestellen gemeinsam, wie in RQ1234, verändert werden. Die cGMP-Empfindlichkeit ist immer sehr gering (Abbildung 10, rechts). Aus diesen Ergebnissen kann man schließen, dass die Bindestelle der dritten Kanaldomäne für die Aktivierung notwendig und hinreichend ist. Das Ergebnis bestätigt: Ein einziges cGMP-Molekül reicht aus, um den CNGK-Kanal zu öffnen.

Für die physiologische Funktion des CNGK-Kanals im Flagellum ist die hohe Empfindlichkeit für cGMP von besonders großer Bedeutung: Das Volumen des Flagellums ist äußerst gering; ein einziges cGMP-Molekül im Flagellum entspricht einer Konzentration von 1 nM. Es werden also nur wenige Moleküle cGMP benötigt, um den CNGK-Kanal zu aktivieren. Wir haben abgeschätzt, dass 40-50 cGMP-Moleküle

bei einer Einzelmolekülstimulation mit *Resact* gebildet werden. Wie viele dieser Moleküle tatsächlich CNGK-Kanäle aktivieren, wissen wir noch nicht. Aber unsere Ergebnisse zeigen eindrucksvoll, wie einzelne Lockstoffmoleküle in Spermien physiologische Reaktionen auslösen und somit die erfolgreiche *Chemotaxis* ermöglichen.

Zusammenfassung und Ausblick

Unsere Ergebnisse zeigen, wie die Signalkaskade bei der *Chemotaxis* von Seeigelspermien abläuft (Abbildung 11). Der Lockstoff *Resact* bindet an die Guanylylzyklase und der Botenstoff cGMP wird gebildet. Einzelne cGMP-Moleküle aktivieren die hoch sensitiven CNGK-Kanäle. Die nachfolgende Hyperpolarisation wirkt auf zwei weitere wichtige Ionenkanäle:

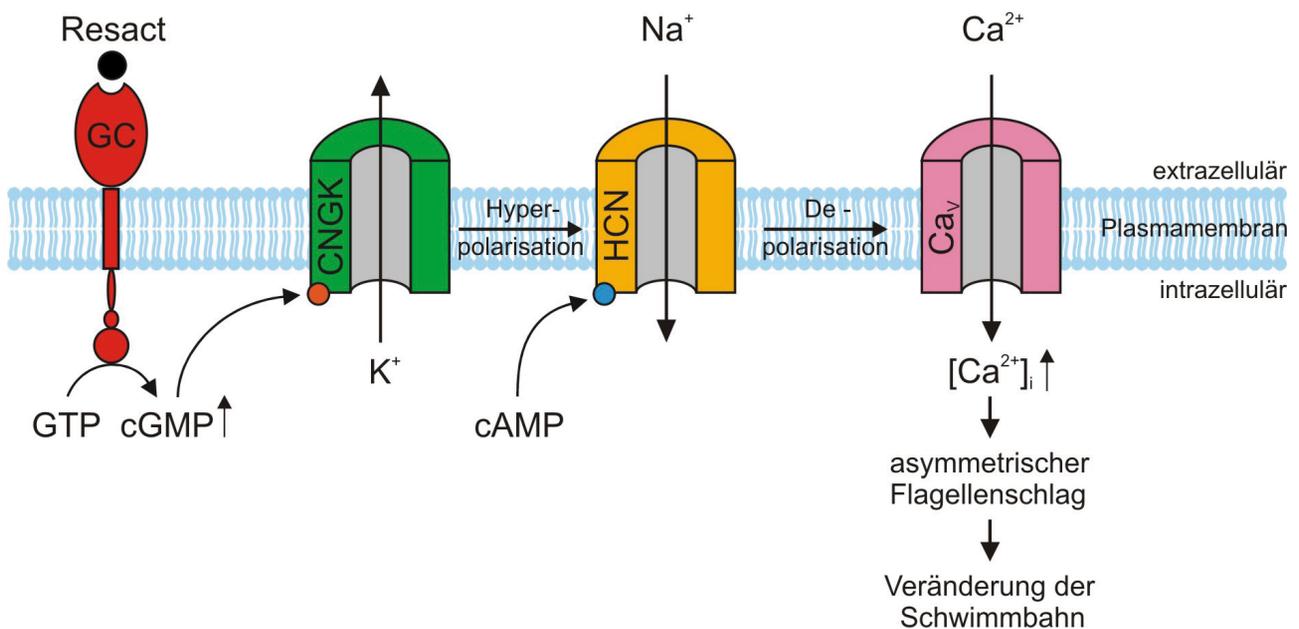


Abbildung 11: Chemotaktische Signalkaskade in Seeigelspermien. Der Lockstoff *Resact* aktiviert eine Guanylylzyklase (GC). Die GC wandelt GTP in cGMP um. Der Botenstoff cGMP aktiviert cGMP-gesteuerte Kaliumkanäle (CNGK) – die Membran hyperpolarisiert. Die Hyperpolarisation aktiviert hyperpolarisationsaktivierte und zyklisch Nukleotid-gesteuerte Ionenkanäle (HCN). Das Öffnen der HCN-Kanäle depolarisiert die Membran. Dadurch werden spannungsgesteuerte Calciumkanäle (Ca_v) aktiviert – Calcium strömt in die Zelle ein. Durch den Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration ([Ca²⁺]_i) ändert sich das Schlagmuster des Flagellums und die Schwimmbahn des Spermiums.



HCN-Kanäle und spannungsabhängige Calciumkanäle. HCN-Kanäle werden durch die Hyperpolarisation geöffnet; ihre Aktivität führt zu einer erneuten Depolarisation der Zelle. Die Calciumkanäle werden durch die Hyperpolarisation von einem inaktiven Zustand in einen geschlossenen Zustand gebracht, so dass sie bei der anschließenden Depolarisation wieder öffnen und Calcium in das Flagellum fließt.

Gibt es ähnlich Signalwege auch in anderen Organismen? In Datenbanken, die die Nukleinsäure- und Aminosäuresequenzen vieler Organismen verwalten, haben wir weitere CNGK-Kanalsequenzen entdeckt. So findet man den CNGK-Kanal in den marinen Wirbellosen *Strongylocentrotus purpuratus* (Seeigel), in *Ciona intestinalis* (Seescheide) und in *Nematostella amurensis* (Seeanemone). Erstaunlicherweise scheinen aber auch Fische wie z.B. *Danio rerio*, der Zebrafisch, CNGK-Kanäle zu besitzen. Könnte es sein, dass in diesen anderen Organismen der CNGK-Kanal auch in Spermien vorkommt und wie in *A. punctulata* an der *Chemotaxis* beteiligt ist? Diese Vermutung ist äußerst spannend, weil man bisher davon ausging, dass sich die Mechanismen der *Chemotaxis* von Spermien in Wirbeltieren und Wirbellosen unterscheiden. Möglicherweise sind die Prozesse in Lebewesen mit externer Befruchtung jedoch ähnlicher als man bisher dachte – unabhängig davon, ob man Wirbeltiere oder Wirbellose betrachtet. Die Charakterisierung von CNGK-Kanälen in Wirbeltieren wird sicher einen großen Beitrag zum Verständnis der Spermien-*Chemotaxis* leisten.

Literatur

- [1] Kaupp UB, Kashikar ND, Weyand I, "Mechanisms of sperm chemotaxis." *Annu. Rev. Physiol.* **70**, 93-117 (2008).
- [2] Strünker T, Weyand I, Bönigk W, Van Q, Loogen A, Brown JE, Kashikar N, Hagen V, Krause E, Kaupp UB, "A K⁺-selective cGMP-gated ion channel controls chemosensation of sperm." *Nat. Cell Biol.* **8** 1149-1154 (2006).



Herstellung von Röntgenoptiken mit fokussierten Ionenstrahlen

JOHANNES LENZ UND STEPHAN IRSEN
Elektronenmikroskopie und Analytik

Zonenplatten werden in Röntgenmikroskopen als Linsen eingesetzt. Mit fokussierter Ionenstrahlung lassen sich die periodischen Muster einer Zonenplatte einfacher und schneller herstellen, als das bisher möglich ist.

Strahlungsquellen wie Freie-Elektronen-Laser, Plasmaquellen oder Röntgenlaser emittieren Licht im Wellenlängenintervall von 1 bis 15 nm, dem Bereich der *weichen Röntgenstrahlung*. Experimente in diesem Spektralbereich sind schwierig, da Röntgenstrahlung nicht mit herkömmlichen Linsen fokussiert bzw. abgelenkt werden kann. Der Grund dafür ist, dass derzeit keine transparenten Materialien mit ausreichender Brechkraft für diese Strahlung bekannt sind. Stattdessen verwendet man optische Elemente, bei denen das Licht an einem periodischen Muster gebeugt wird. Ein Beispiel dafür sind sogenannte Zonenplatten, bei denen diese periodischen Muster aus konzentrischen Ringen bestehen. Typische Strukturbreiten liegen zwischen 15 und 100 nm [1]. Zonenplatten werden zur Zeit ausschließlich mittels Elektronenstrahlolithographie und anschließender Nanostrukturierung hergestellt, einem mehrstufigen und zeitaufwändigen Verfahren. Mit einem *Focused-Ion-Beam*-Gerät (FIB) wollen wir röntgenoptische Komponenten in einem einzigen Arbeitsschritt fertigen. Kooperationspartner ist das Institut für X-Optik¹ in Remagen.

¹ Prof. Thomas Wilhein, Fachhochschule Koblenz, RheinAhrCampus Remagen

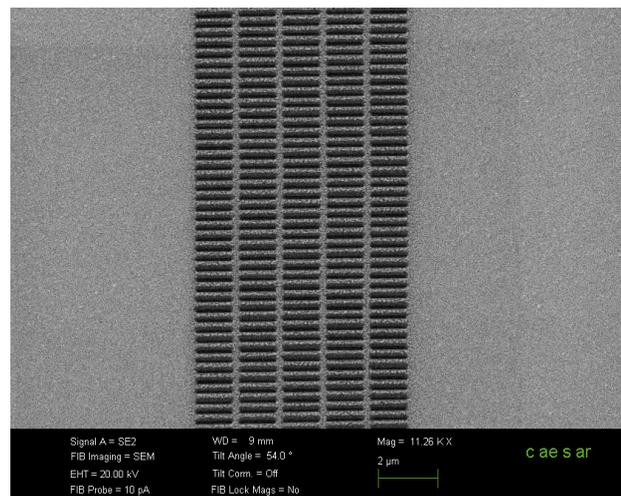


Abbildung 1: Liniengitter, das mit einem FIB-Mikroskop in eine Si_3N_4 -Membran geschrieben wurde.

Was ist eine Beugungsoptik?

In Röntgenoptiken wird das einfallende Licht aufgrund von Beugung an einem periodischen Muster, z.B. einer Gitterstruktur, abgelenkt. Je nach Ausführung können Optiken als Transmissions- und Reflektionsgitter hergestellt werden. Abbildung 1 zeigt ein Beispiel für eine solche Struktur, ein Liniengitter. Das einfallende Licht wird an den Gitterstegen abhängig von seiner Wellenlänge gebeugt. Dabei bestimmt der Abstand zwischen den Mittelpunkten zweier benachbarter Linien (Gitterkonstante) den Winkel der Ablenkung. Bei einer gegebenen

Wellenlänge erlauben kleinere Gitterkonstanten größere Ablenkungswinkel. Für Experimente mit weicher Röntgenstrahlung werden Gitterkonstanten zwischen 50 und 500 nm eingesetzt.

Neben der Größe der Strukturen ist auch ihre Anzahl wichtig: die Intensität des Beugungsbildes nimmt zu, je mehr Linien beleuchtet werden [2]. Ein Problem bei der Herstellung von Liniengittern in einem FIB-Mikroskop ist, dass es gerätebedingt nicht möglich ist, sehr kleine Strukturen (Gitterkonstante <100 nm) zu erzeugen, ohne gleichzeitig die bearbeitbare Fläche und damit die Gesamtzahl der Linien zu reduzieren. Hier muss, abhängig vom späteren Verwendungszweck des Gitters, ein Kompromiss zwischen Gitterkonstante und Linienanzahl gefunden werden.

Das Zeiss XB1540 *Focused-Ion-Beam-Mikroskop*

In einem *Focused-Ion-Beam-Mikroskop* (FIB) werden zusätzlich zum Elektronenstrahl Ga^+ -Ionen verdampft, beschleunigt und als fokussierter Ionenstrahl computergesteuert über die Probenoberfläche gerastert (Abbildung 2). Aufgrund des hohen Impulses der Ionen werden beim Auftreffen auf die Oberfläche Atome aus ihr herausgelöst. So lassen sich nahezu beliebige Strukturen in die Probe schreiben. Die Geräte werden seit ca. 5 Jahren zur Probenpräparation für die Transmissionselektronenmikroskopie eingesetzt. In FIB-Mikroskopen der neuesten Generation können beide Strahlenquellen (Elektronen und Ionen) gleichzeitig verwendet und so der Schreibvorgang mit dem Elektronenstrahl beobachtet werden.

Dadurch wird die Schreibgenauigkeit derart verbessert, dass sich FIB-Mikroskope nun auch für die Nanostrukturierung von Oberflächen einsetzen lassen [3]. Wir nutzen in diesem Projekt die Nanostrukturierung mit fokussierten Ionenstrahlen erstmals dafür, ein Reflektionsgitter für die Verwendung als Röntgenoptik herzustellen.

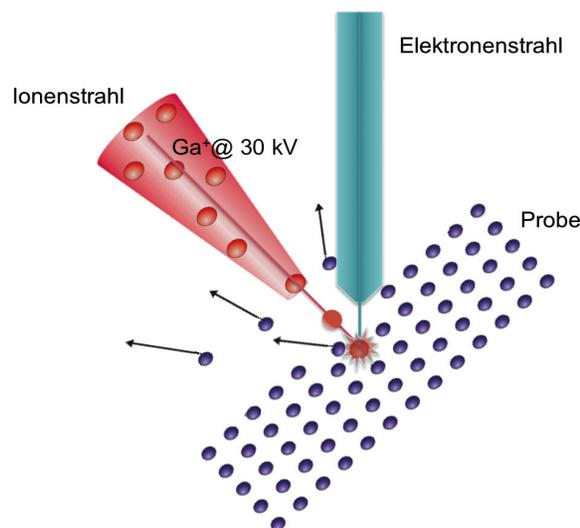


Abbildung 2: Konzeptskizze eines Zweistrahl-FIB-Mikroskops. Elektronen- und Ionenstrahl treffen sich auf der Probenoberfläche.

Ergebnisse

Damit ein großer Anteil des einfallenden Lichtes in einer reflektierenden Röntgenoptik gebeugt wird, benötigt man ein Material mit hohem Reflektionskoeffizienten. In einem ersten Schritt wurden die optischen Eigenschaften verschiedener Materialien beurteilt. Abbildung 3 zeigt die Reflektionskoeffizienten von 15 nm dünnen Metallschichten (Chrom, Gold und Zink) und dem Halbleiter Silizium bei einem Einfallswinkel des Röntgenstrahls von 5° [4]. Die Reflektivität der meisten Materialien für weiche Röntgenstrahlung ist so gering,

dass man die Optiken in Totalreflektion, d.h. unter sehr kleinen Einfallswinkeln ($1 - 10^\circ$), einsetzt.

Im Wellenlängenintervall von 5 nm bis 20 nm zeigt Gold eine maximale Reflektivität von über 80%. Bei Chrom ist sie etwas niedriger, dafür ändert sich der Reflektionskoeffizient im gesamten Wellenlängenbereich weniger. Dies kann bei bestimmten Experimenten zur Charakterisierung einer Röntgenquelle von Vorteil sein. Die beiden anderen Materialien, Silizium und Zink, scheiden aufgrund der schlechteren Reflektionscharakteristik aus.

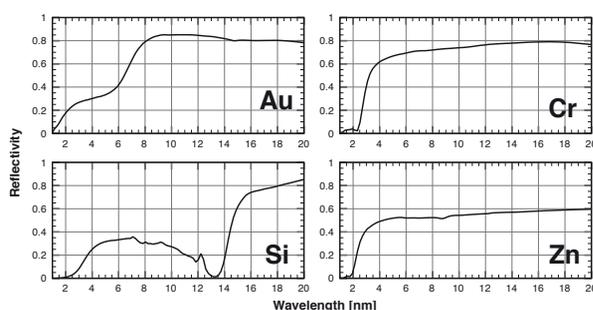


Abbildung 3: Reflektionseigenschaften von 15 nm Gold (Au), Chrom (Cr), Silizium (Si) und Zink (Zn) [4].

Ein zweiter wichtiger Punkt bei der Materialauswahl ist das Verhalten des Materials unter Ionenbeschuss. Die auftreffenden Ionen können auf Grund ihrer Masse und ihrer Geschwindigkeit Atome aus der Oberfläche herausgelöst. Die Sputterausbeute ist ein Maß dafür, wie viele Atome pro Ion aus der Oberfläche herausgeschlagen werden können. In Abbildung 4 sind Ergebnisse einer Monte-Carlo-Simulation mit dem Programm SRIM dargestellt [5]. Berechnet wurden die Ionenbahnen von 5000, mit 30 kV beschleunigten Gallium-Ionen nach der Kollision mit Gold- und Chrom-beschichteten

Siliziumsubstraten. Die berechnete durchschnittliche Sputterausbeute beträgt für Gold 14,5 und für Chrom 5,0 Atome pro auftreffendem Ga-Ion. Es ist zu erkennen, dass die Ionen in Gold ca. doppelt so lange Strecken wie in Chrom zurücklegen. Bei gleichen Prozessparametern sollten die in Chrom geschriebenen Linien also deutlich kleinere Dicken zeigen.

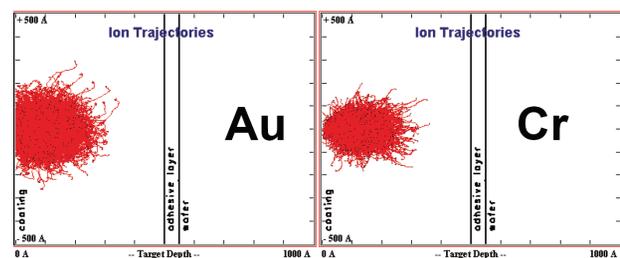


Abbildung 4: Simulierte Ionenbahnen für Ga-Ionen bei einer Beschleunigungsspannung von 30 kV in Gold (links) und Chrom (rechts) [5].

Um die Simulationsergebnisse experimentell zu überprüfen, wurden mittels Magnetron-sputtern 50 nm Gold und Chrom auf Siliziumsubstraten abgeschieden. Am FIB-Mikroskop wurden anschließend jeweils sechs Linien mit einem Strahlstrom von 10 pA in die Gold- und Chromschichten geschrieben (Abbildung 5) und dabei die Schreibgeschwindigkeit mit jeder Linie erhöht. Bei höherer Schreibgeschwindigkeit ist die Verweilzeit des Ionenstrahls (gemessen in ms/Pixel) geringer; das führt zu einer kleineren Linienbreite.

Erwartungsgemäß bilden sich in der Goldschicht verglichen mit Chrom etwa doppelt so breite Linien. Es fällt auch auf, dass die Linien in der Chromschicht klarer begrenzt sind und insgesamt homogenere Strukturen

entstehen. Das lässt sich damit erklären, dass Chrom im Gegensatz zu Gold beim Sputtern nicht zu inselförmigem Schichtwachstum neigt.

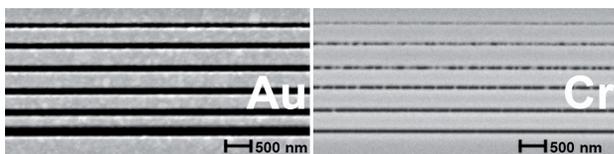


Abbildung 5: Rasterelektronenmikroskopische Darstellung von Linien, die mit einem Ga-Ionenstrahl in Metallschichten geschrieben wurden. Linkes Bild Gold, rechtes Bild Chrom, Schichtdicke 50 nm, Strahlstrom 10 pA, Verweilzeit pro Pixel von unten nach oben 280, 233, 187, 140, 93, 47 ms/pixel.

Zur weiteren Charakterisierung der Schichten wurden Untersuchungen an einem Rasterkraft-Mikroskop durchgeführt. Abbildung 6 zeigt das Höhenprofil eines Gitters mit der Steglänge 15 μm , das in eine 15 nm dünne Chromschicht geschrieben wurde. Die Verweildauer des Ionenstrahls bei der Herstellung betrug 200 ms/pixel; der Strahlstrom wurde auf 10 pA eingestellt. Mit diesen Parametern wird eine durchschnittliche Tiefe der Struktur von 11 nm erreicht. Bei der Auswertung der Muster zeigen sich Fehler bei der Linienpositionierung während des Herstellungsprozesses.

Die Gitterkonstante ($g = 190 \text{ nm}$, entspricht 5260 Linien/mm) der erzeugten Struktur hat eine Standardabweichung von 10%. Dieser Fehler entsteht durch eine gerätebedingte Ungenauigkeit der Strahlpositionierung im FIB-Mikroskop. Ein kleineres Schreibfeld reduziert diesen Fehler, dabei sinkt jedoch die Gesamtzahl der schreibbaren Linien. Dies verschlechtert die spektrale Auflösung des Beugungsmusters.

Weitere limitierende Faktoren bei der Strukturierung sind eine Drift der Probe oder des Ionenstrahls sowie der am Gerät eingestellte Strahlstrom. Eine Drift begrenzt die maximale Dauer des Strukturierungsprozesses. Höhere Strahlströme verkleinern die Herstellungszeit, vergrößern aber gleichzeitig den Strahldurchmesser und limitieren so die erreichbare Gitterkonstante.

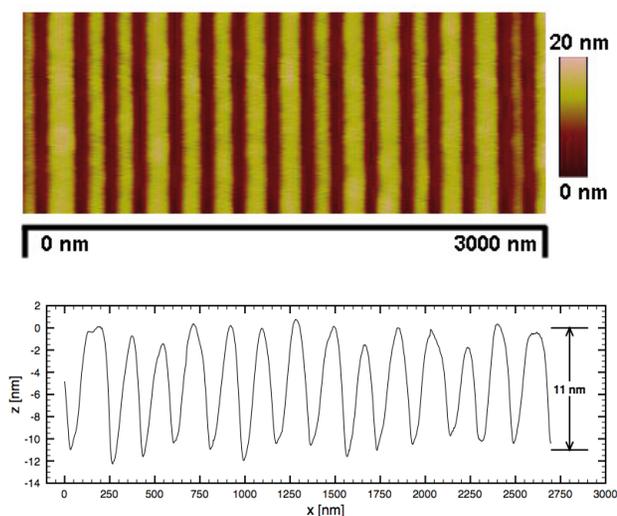


Abbildung 6: Rasterkraftmikroskopische Aufnahme eines Gitters (oben) und dazugehöriges Höhenprofil (unten). Gitterkonstante $g = 190 \text{ nm}$, Verweilzeit 200 ms/pixel, Strahlstrom 10 pA.

Zusammenfassung und Ausblick

Es konnte gezeigt werden, dass ein FIB-Mikroskop geeignet ist, im Routinebetrieb Gitterstrukturen mit einer Periodizität herzustellen, die kleiner als 200 nm ist. Der Aufwand hierfür ist deutlich geringer als bei der konventionellen Methode mittels Elektronenstrahlolithographie und anschließender Nanostrukturierung. Mit den FIB-Strukturen können beispielsweise die Emissionsspektren von Röntgenquellen bestimmt werden.



In Zukunft sollen zusätzlich zu den hier beschriebenen Reflektionsoptiken auch Transmissionsoptiken hergestellt werden. Dazu sollen Si_3N_4 -Membranen mit einer Dicke von etwa 100 nm freitragend strukturiert werden. Anwendungsfelder für diese Beugungsstrukturen sind beispielsweise interferometrische Experimente mit weicher Röntgenstrahlung und spektroskopische Untersuchungen an laserinduzierten Plasmaquellen.

Literatur

- [1] Chao W et al, "Soft X-Ray Microscopy at a Spatial Resolution Better than 15 nm." *Nature* **435**, 1210-1213 (2005).
- [2] Attwood D, "Soft X-Rays and Extreme Ultraviolet Radiation: Principles and Applications." *Cambridge University Press* (2007).
- [3] Moberly Chan WJ et al, "Fundamentals of Focused Ion Beam Nanostructural Processing: Below, At, and Above the Surface." *MRS Bulletin*, Volume **32** (2007).
- [4] Henke BL et al, "X-ray interactions: Photoabsorption, Scattering, Transmission, and Reflection at $E=50-30000$ eV, $Z=1-92$." *Atomic Data and Nuclear Data Tables* Vol. **54** (no.2), 181-342 (1993).
- [5] Ziegler JF, SRIM Version 2008.05, www.SRIM.org (2009).



Schwarzer Kiefernprachtkäfer als Vorbild für mikrotechnischen Infrarotsensor

MANFRED LACHER

Mikrosystemtechnologie

Der Schwarze Kiefernprachtkäfer (*Melanophila acuminata*) mag es heiß: Seine Larven ernähren sich am liebsten von frisch verbranntem Holz, das er mit Hilfe spezieller Infrarotsensoren aufspürt. Sie basieren auf einem ungewöhnlichen Funktionsprinzip: Der Käfer nutzt einen Mechanorezeptor, der wie die Haarsinneszellen im Ohr funktioniert. Er scheint also Feuer gewissermaßen zu „hören“. In Kooperation mit Wissenschaftlern der Universität Bonn und des Forschungszentrums Jülich bauen wir den Käfersensor nach.

Waldbrände verursachen weltweit jährlich Schäden in zweistelliger Milliardenhöhe. Brandkatastrophen, wie zuletzt im Februar 2009 in Australien, fordern leider häufig auch Menschenleben. Bedingt durch die globale Erwärmung werden Waldbrände in den kommenden Jahren weiter zunehmen. Damit Waldbrände nicht außer Kontrolle geraten, ist es wichtig, einen Brand so früh wie möglich zu entdecken. Nach wie vor werden dafür Feuerwachtürme eingesetzt, die aber nicht ständig besetzt sind. Auf der Suche nach besseren Frühwarnsystemen, die automatisch und rund um die Uhr größere Waldgebiete überwachen, lohnt sich ein Blick in die Natur.

Ein „cooler“ Wärmesensor

Es gibt Insekten, die als perfekte Fernortungssysteme für Waldbrände bezeichnet werden können. Dazu gehört der Prachtkäfer der Gattung *Melanophila* (Abbildung 1). Dieser Käfer ist mit 12 Arten auf der nördlichen Erdhalbkugel vertreten und kann aus sehr

großen Entfernungen Waldbrände anfliegen.



Abbildung 1: Der Schwarze Kiefernprachtkäfer *Melanophila acuminata* kann aus großen Entfernungen Waldbrände detektieren.

Die Ortungsleistung der nur knapp 1 cm großen Käfer lässt selbst Fachleute staunen. 1924 kam es in Coalinga (Kalifornien) zu einem Massenanflug von *Melanophila*-Käfern auf ein brennendes Öltanklager. Das Tanklager befand sich mitten in einem trockenen Wüstengebiet; der nächstgelegene Wald, in dem sich die Käfer vordem Brand sehr wahrscheinlich aufgehalten

haben, lag etwa 80 km entfernt. Die Käfer mussten also das Feuer aus dieser extrem großen Entfernung detektiert haben. Solche Berichte machten die Käfer für die bionische Forschung interessant.

Melanophila-Käfer besitzen auf jeder Körperseite unterhalb der Flügelansatzstellen ein Infrarot-(IR)-Sinnesorgan, mit dem sie Waldbrände aufspüren können. In einem Organ (Durchmesser ca. 100 μm) sind ungefähr 70 kuppelförmige IR-Rezeptoren untergebracht; sie liegen, dicht zusammengepackt, in einer grubenförmigen Vertiefung. Der Käfer verfügt also über ein stark miniaturisiertes IR-Sensorarray, dessen dreidimensionaler Aufbau mit Hilfe der Elektronenmikroskopie aufgeklärt werden konnte (Abbildung 2). Die IR-Strahlung löst eine mikromechanische Reaktion aus, die von einer mechanosensitiven Sinneszelle gemessen wird; die Membran der

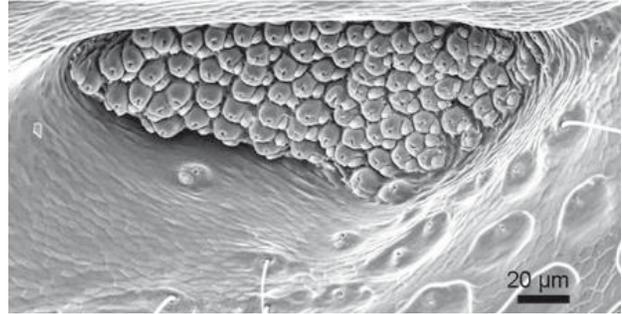
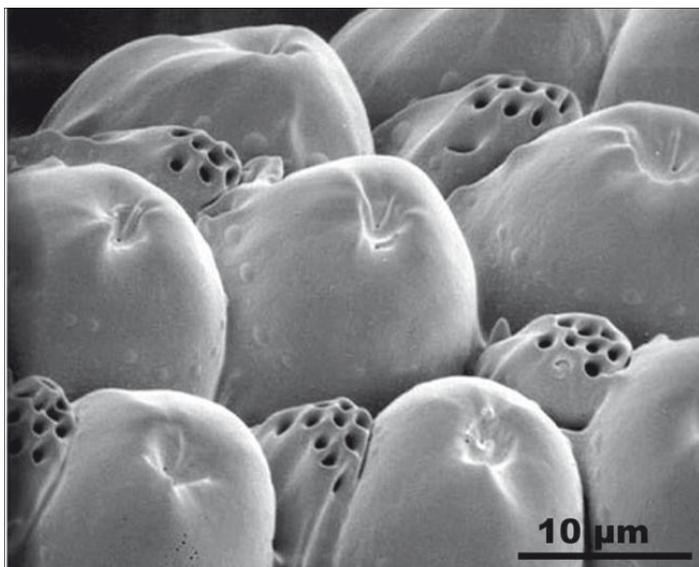
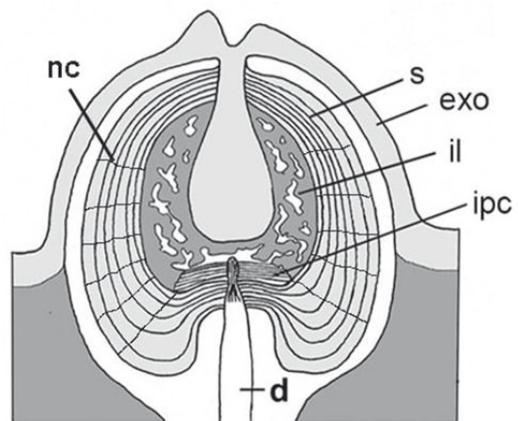


Abbildung 2: Rasterelektronische Darstellung eines IR-Organs des Schwarzen Kiefernprachtkäfers. Am Boden der ca. 100 μm tiefen Grube befinden sich ungefähr 70 IR-Rezeptoren. Der Durchmesser dieser kuppelförmigen Rezeptoren beträgt 12 – 15 μm .

Sinneszelle wird dabei deformiert. Untersuchungen lassen vermuten, dass sich der IR-Rezeptor direkt aus einem Mechanorezeptor entwickelt hat, der bei allen Insekten zu finden ist. Abbildung 3 (b) zeigt einen schematischen Querschnitt durch einen IR-Rezeptor. Wie die IR-Strahlung zur mechanischen Reaktion führt, ist im Detail noch un-



(a)



(b)

Abbildung 3: Einige kuppelförmige IR-Rezeptoren in höherer Vergrößerung und eine Schemazeichnung durch einen IR-Rezeptor. s: äußere Schale der Kugel aus harter Exokutikula mit hindurchlaufenden Nanokanälen (nc), exo: harte Exokutikula, il: innere schwammartige Region aus weicherer Mesokutikula, ipc: Innere Druckkammer, in die die drucksensible Spitze des Mechanorezeptors (d) hineinragt.

geklärt. Derzeit gehen wir davon aus, dass die vom IR-Rezeptor absorbierte Strahlung dazu führt, in wenigen Millisekunden im Inneren der Kugel einen Druckanstieg zu erzeugen, der von der Haarsinneszelle „gehört“ wird. Wir vermuten, dass der Prozess wie folgt abläuft: Im Kugellinneren befindet sich eine schwammartige Struktur aus Mesokutikula (**il** in Abbildung 3 (b)), deren Hohlräume mit Flüssigkeit gefüllt sind. Die Schale der äußeren Kugel hingegen besteht aus harter, mit Chitinfasern verstärkter Kutikula (**s**). Daher kann die impulsartige Ausdehnung der Mesokutikula und der Flüssigkeit nur dadurch kompensiert werden, dass die Flüssigkeit in der Kugel in Richtung der inneren Druckkammer (**ipc**) verdrängt wird und dort die Spitze des Mechanorezeptors (**d**) verformt. Diese Verformung erzeugt das elektrische Signal für den Käfer. Der Käfer hat somit ein schnell reagierendes Thermometer für den infraroten Bereich; er fühlt Wärme. Aber warum lässt sich der Sensor durch eine langsame Wärmeveränderung der Umgebung nicht stören? Die Ursache konnte erst vor kurzem mit Hilfe eines Rasterelektronenmikroskops erklärt werden und ist noch spekulativ: In der harten Kutikula (**s**) der Sensorkugel befinden sich Nanokanäle (Durchmesser < 100 nm), durch die ein langsamer Druckanstieg sofort ausgeglichen wird. Der Käfer besitzt also einen mikrofluidischen IR-Sensor, in dem die Flüssigkeit in den Hohlräumen dazu genutzt wird, kurze Druckimpulse auf den Mechanosensor zu übertragen. Dieses Prinzip wird als „photo-mechanisch“ bezeichnet; es wird nun auf einen technischen Sensor übertragen.

Mikrotechnologische Umsetzung

Wir stellen den IR-Sensor mit Silizium-Technologie her. In Abbildung 4 ist der Aufbau dargestellt. Die Druckkammer besitzt ein Fenster, das für IR-Strahlung durchlässig ist. Die Flüssigkeit in der Druckkammer absorbiert die eintreffende IR-Strahlung; die Flüssigkeit erwärmt sich und dehnt sich aus. Ein Mikroplattenkondensator übernimmt die Rolle des biologischen Mechanorezeptors: Eine der beiden Elektroden des Kondensators fungiert als flexible, dünne Membran. Die sich ausdehnende Flüssigkeit in der Druckkammer lenkt die Membran aus; dadurch ändert sich die Kapazität des Kondensators. Diese Kapazitätsänderung wird als Messsignal genutzt. Wir mussten folgendes Problem beachten: Wird die Membran ausgelenkt, so verändert sie den Druck in der mit Luft gefüllten Kondensatorkammer. In einem geschlossenen Kondensatorraum würde dadurch die Amplitude der Auslenkung gedämpft und so das Messsignal schwächer werden. Daher haben wir die obere Elektrode perforiert. Eine Änderung der Umgebungstemperatur, zum Beispiel zwischen Tag und Nacht, bewirkt eine langsame Druckänderung in der Druckkammer. Wie können wir, entsprechend dem biologischen Vorbild, derartig langsame Druckänderungen kompensieren? Wir haben den IR-Sensor mit einer Druckausgleichskammer versehen, die mit der Druckkammer über eine Mikrokapillare verbunden ist. Die Druckausgleichskammer enthält eine dünne, weiche Deckel-Membran aus Silikon (PDMS), die Volumenänderungen der Flüssigkeit drucklos kompensiert. In Abbildung 5 wird verdeutlicht, wie wir die wesentlichen Eigen-

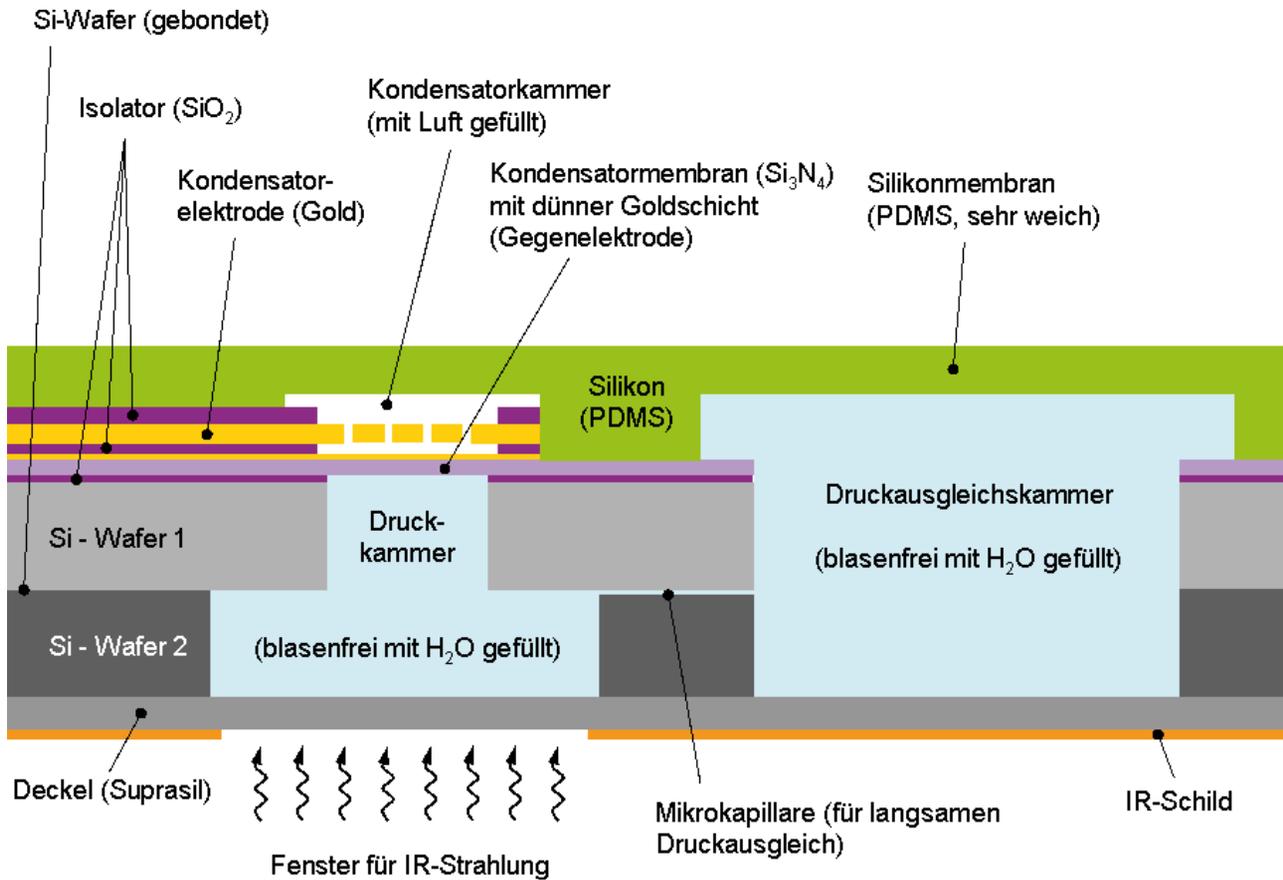


Abbildung 4: Querschnitt des technologischen Entwurfs des IR-Sensors (nicht maßstabsgetreu). Gesamtsensordicke incl. Deckel: ca. 0,9 mm, Chipbreite: 5 mm.

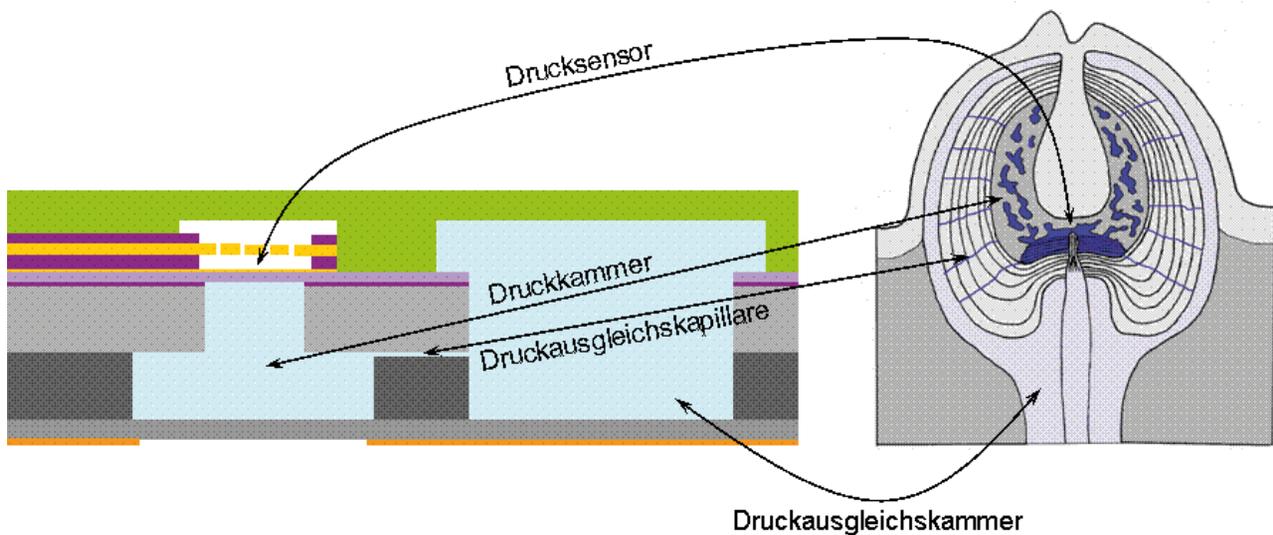


Abbildung 5: Technologische Umsetzung des biologischen Vorbilds.

schaften des biologischen Vorbilds übertragen haben. Abbildung 6 zeigt die Anordnung der Sensoren („Chips“) auf einem 4“-Wafer und einen vergrößerten Ausschnitt eines Sensor-Layouts. Man erkennt hier, wie die Länge der Druckausgleichskapillare und der Durchmesser der Kondensatormembran variiert wurden, um die optimalen Parameter des Sensors zu ermitteln. Auf einem 4“-Wafer befinden sich in unserem Layout 408 Sensoren. Der Sensorchip ist derzeit $2 \times 5 \text{ mm}^2$ groß; wesentlich kleinere Ausführungen sind in der Silizium-Technologie jedoch relativ einfach machbar.

Knifflige technologische Probleme

Eine besondere Schwierigkeit bei der Herstellung des Sensors ist das blasenfreie Füllen der Mikrokammern und -kanäle mit Flüssigkeit. Dies ist in der Mikrotechnologie ein generelles Problem, das bisher nicht

befriedigend gelöst worden ist. Die von uns gefundene Methode erwies sich in ersten Versuchen als vielversprechend. Ist dieser mikrotechnologische Sensor als Branddetektor geeignet und ist er so empfindlich wie sein biologisches Vorbild? Die Projektpartner im FZ Jülich und an der TU Dresden haben Modellrechnungen für unseren Sensor durchgeführt: Bei einem Waldbrand mit einer Feuerfläche von 100 m^2 und einer typischen Strahlungstemperatur von 1100 °K ist in 2 km Entfernung eine Wärmeleistung von 10 W/m^2 zu erwarten. Diese Wärmeleistung wird in der Druckzelle absorbiert und führt zu einer Auslenkung von $1 \text{ }\mu\text{m}$, was einer Kapazitätsänderung von $0,4 \text{ pF}$ entspricht. Gerechnet wurde dies für eine Membran mit einem Durchmesser von $0,5 \text{ mm}$ und einer Dicke von $1 \text{ }\mu\text{m}$. Eine Herausforderung besteht darin,

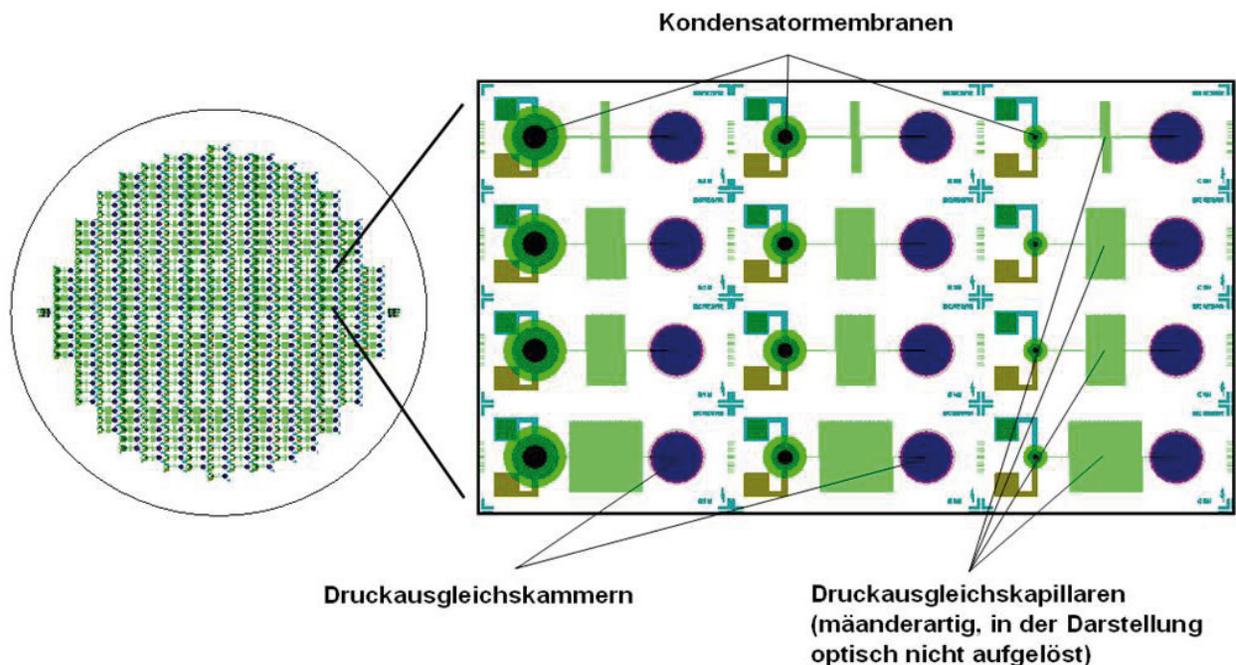


Abbildung 6: Layout eines IR-Sensors. Gezeigt sind die aufeinander projizierten Masken der Kondensatormembranen, Kammern und Druckausgleichskapillaren.



Methoden zu entwickeln, mit denen man solch kleine Kapazitätsänderungen bei dem zu erwartenden hohen Signalrauschen zuverlässig messen kann.

Literatur

- [1] Schmitz A, Sehrbrock A, Schmitz H, "The analysis of the mechanosensory origin of the infrared sensilla" in *Melanophila acuminata* (Coleoptera; Buprestidae) adduces new insight into the transduction mechanism." *Anthrop Structure & Development* **36**, 291-303 (2007).
- [2] Müller M, Olek M, Giersig M, Schmitz H, "Micromechanical properties of consecutive layers in specialized insect cuticle: the gula of *Pachnode marginata* (Coleoptera; Scarabaeidae) and the infrared sensilla of *Melanophila acuminata* (Coleoptera, Buprestidae) *J. Exp. Biol.* **211**, 2576-2583 (2008).
- [3] Bousack H, Schmitz H, Müller M, Offenhäusser A, "A Fluidic Infrared Detector Based on the Infrared Sensilla in the Beetle *Melanophila acuminata*." *Proceedings Eurosensors XXII*, Dresden, 144-147 (2008).
- [4] Bousack H, Schmitz H, Offenhäusser A, "Design of a Fluidic Infrared Detector Based on the Infrared Sensilla in the Beetle *Melanophila acuminata*". *Actuator 2008, 11th International Conference in New Actuators*, Bremen, 768-789 (2008).

Wo, bitte, geht's denn hier zum Ei?

CATARINA PIETSCHMANN, FREIE WISSENSCHAFTSJOURNALISTIN

Beitrag aus MaxPlanckForschung 2.2009.

caesar dankt für die freundliche Genehmigung zum Abdruck des Artikels.

Seeigelspermien schwimmen immer der Nase nach. Die sitzt an ihrem Schwanz und zählt oder rechnet mehr, als dass sie riecht. Ein seltsamer Prozess, den Wissenschaftler um Benjamin Kaupp molekular aufgeklärt haben.

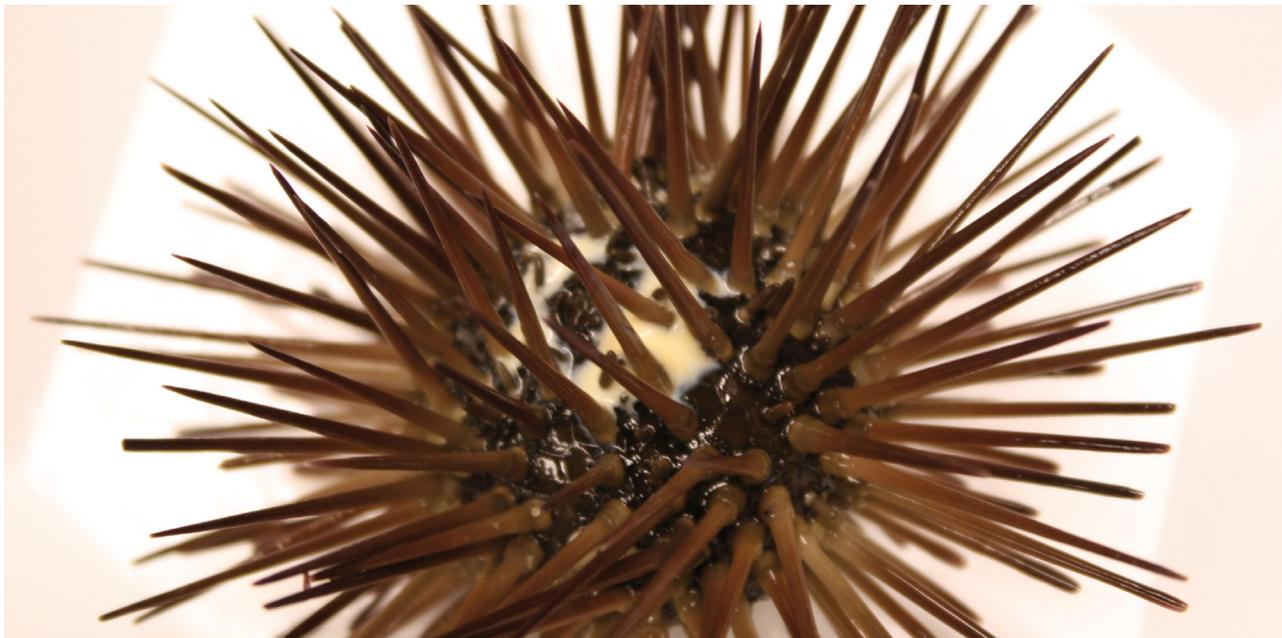


Abbildung 1: Seeigel stoßen rund 100 Milliarden Spermien aus, die im offenen Wasser den Signalen der Eizelle folgen.

Nachwuchs zu bekommen ist nicht immer leicht. Vor allem dann nicht, wenn das eigene Zuhause unter Wasser liegt und die Nachbarn – eine skurrile Gesellschaft aus schwerfälligen Verwandten und flinken, verfressenen Flossenträgern – ständig die Privatsphäre kreuzen. Als wirbelloser Seeigel hat man es besonders schwer. Denn für jemanden, der ein Außenskelett aus Kalk mit Hunderten

von pieksigen Nadeln trägt, kommt Sex im eigentlichen Sinne gar nicht infrage. Befruchtung? Ja, aber bitte nur außerhalb des Körpers!

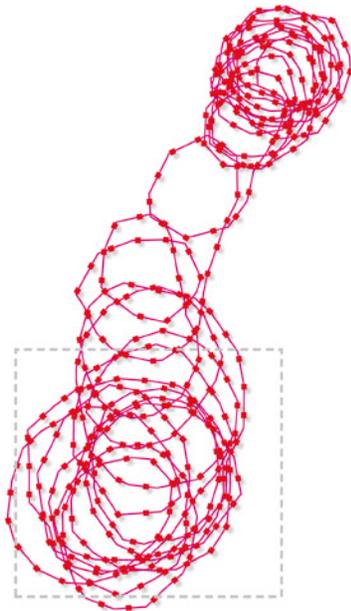
Zwecks Fortpflanzung finden sich Seeigel einmal im Jahr am Meeresboden zusammen, oft in Gruppen von bis zu 30 Individuen. Dicht aneinandergedrängt geben sie Eizellen und Spermien ab – je nach Art in Tiefen von bis zu 40

Metern. Diese konzertierte Aktion erhöht die Erfolgsaussichten, denn die Strömung, Fische und anderes Meerestier, das auf der Suche nach eiweißreichen Snacks vorbeischwimmt, durchkreuzen das Vorhaben. Deshalb wird auch geklotzt und nicht gekleckert: Ein Seeigelmännchen schießt im Schnitt etwa 100 Milliarden (!) Spermien ins Rennen – zum Vergleich: Ein Mann bringt es nur auf 200 Millionen –, das Weibchen gibt 50 000 Eizellen ab.

Das eigentlich Erstaunliche ist jedoch, dass selbst wenn neben ihnen andere

Seeigelarten, Schnecken, Fische oder sonstige Biotopmitbewohner ebenfalls mit extrakorporaler Nachwuchsproduktion beschäftigt sind, keine zufälligen Mischkreaturen entstehen. Keine „Seesternigel“, keine „Igelschnecken“, keine „Fischigel“. Nicht einmal Kreuzungen zwischen den insgesamt rund 900 Seeigelarten. Nein, zielsicher finden die Seeigelspermien zu den Eizellen ihrer eigenen Art. Als wäre Magie im Spiel. Das Zauberwort dafür heißt *Chemotaxis*.

Es bedeutet so viel wie „Aufmarsch in Richtung einer chemischen Substanz“. Und genauso



Grafiken: Christoph Schneider nach Vorlagen von caesar



Abbildung 2: Drift zum Ei. Links: Ohne Lockstoff zieht das Spermium im oberen Bildkreis ziellos Kreise. Sobald die Forscher in dem Kästchen den Signalstoff der Eizelle freisetzen, folgt es der steigenden Konzentration und bewegt sich auf einer driftenden Kreisbahn zu dessen Quelle. Rechts: Die Bahn, der das Spermium folgen würde, wenn seine Bewegung nur vom Zufall bestimmt würde (*random walk*); solchen Bahnen folgen etwa Moleküle in einem Gas.



es ist dann auch: Hungrige Bakterien und Amöben nutzen diese Technik; sie bewegen sich wie schnuppernde Hunde in unregelmäßigem Zickzacklauf – im Englischen *random walk* genannt – auf ihre Nahrungsquellen zu. Und die Spermien? Sie folgen der Spur eines Lockstoffes, den die Eizelle aussendet. In einem Muster, das einer gekrümmten Helix gleicht, schwimmen die 50 bis 60 Mikrometer langen Wesen aktiv in Richtung der höher werdenden Konzentration. Klingt eigentlich simpel: Immer der Nase nach! Doch ganz so einfach ist es nicht.

Am Bonner Forschungsinstitut caesar untersucht Benjamin Kaupp mit seinem Team, wie das im Einzelnen funktioniert. Molekulare Neurosensorik ist der Überbegriff für seine Arbeit und so heißt auch seine Abteilung. Seit über 30 Jahren erforscht der Biophysiker, wie Reize von Sinneszellen erfasst und beantwortet werden. Beim Sehprozess, beim Riechen oder eben der *Chemotaxis* von Spermien. Drei sehr unterschiedliche Vorgänge, die aber vieles gemein haben. Jede Sinneszelle wandelt Reize über eine Kette von biochemischen Reaktionen in elektrische Signale um. Ionenkanäle, die meist aus mehreren großen Proteinen bestehen, spielen dabei eine zentrale Rolle.

Lockstoffrezeptoren am Schwanz

In Bonn interessiert man sich vor allem für sogenannte zyklische Nukleotid-gesteuerte Kanäle (CNG-Kanäle) und Schrittmacher-Kanäle (HCN-Kanäle). CNG-Kanäle sitzen beispielsweise in der Membran der hochsensiblen Stäbchenzellen in unserer Netzhaut. „Nach Einfangen eines einzelnen Lichtquants, schließen sich Hunderte von

Ionenkanälen in der Zellmembran“, sagt Kaupp. Er hat den molekularen Aufbau der CNG-Kanäle entschlüsselt und dabei herausgefunden, dass diese Kanäle bei Farbenblindheit eine wichtige Rolle spielen. Ähnliche Ionenkanäle wurden in den 1990er-Jahren auch in den als Zapfen bezeichneten Sehzellen und den feinen Härchen der Riechzellen gefunden.

Bei der Suche in anderen Geweben stieß Kaupps Gruppe 1997 auf merkwürdige Kanäle in den Spermien des Seeigels *Strongylocentrotus purpuratus*. Sie verhielten sich ganz wie jene, die bei Säugetieren Herzschlag und rhythmische Aktivität von Nervenzellen steuern. Echte Schrittmacherkanäle eben. Bloß, was haben die in Spermien zu suchen? Sind sie ein kostbares Werkzeug, das nur für besondere Zwecke eingesetzt wird? Hier womöglich für die *Chemotaxis*?

Grund genug also, sich die Spermien genauer anzusehen. Mit welchem Sinnesorgan erkennen sie eigentlich ihren Lockstoff? Schließlich sind sie keine intelligenten Lebewesen; sie verfügen über keine echte Nase, geschweige denn Nervenzellen, die sensorische Reize an ein Gehirn weiterleiten könnten. Und Letzteres haben sie ohnehin nicht. Ihr Kopf beherbergt nur die Erbinformation ihrer Spezies. Ihr einziger Daseinszweck besteht darin, diese in die Eizelle zu befördern. Doch an ihrem Schwanz, dem Flagellum, sitzen über eine Million Rezeptoren für den Lockstoff – die Nase sitzt also praktisch an den Füßen.

Warum wird ein so entscheidender Schritt der Fortpflanzung eigentlich am Seeigel

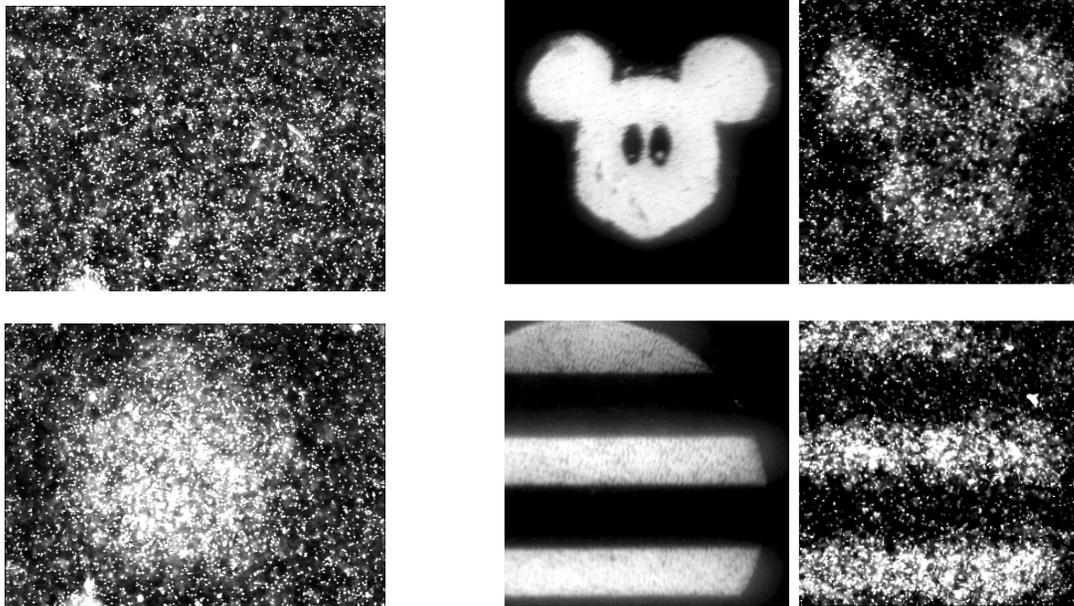


Abbildung 3: UV-Blitz als Startsignal. Links: Die Spermien bewegen sich ziellos (oben), bis der Blitz in einem Kreis den Lockstoff freisetzt. Dann strömen sie zu einem hellen Fleck zusammen (unten). Rechts: Der Lockstoff lässt sich auch unter einer Micky-Maus- oder einer Streifenmaske freisetzen. Die Spermien bilden dann das Muster der Maske nach.

untersucht? „Das hat historische Gründe“, erklärt Kaupps Mitarbeiter Timo Strünker, „denn die *Chemotaxis* von Spermien wurde vor etwa 100 Jahren zufällig beim Seeigel entdeckt.“ Im Marine Biological Laboratory in Woods Hole an der Ostküste der USA machte Frank R. Lillie eine seltsame Beobachtung, die er im Oktober 1912 in *SCIENCE* publizierte: Nachdem er einige Tropfen Meerwasser, in dem sich zuvor unbefruchtete Eizellen des Seeigels *Arbacia punctulata* befanden, zu Spermien der gleichen Art gegeben hatte, sah er, dass „die Spermien so heftig verklumpten, dass dies mit bloßen Auge zu erkennen war“. Lillie glaubte, dies passiere, weil die Eizellen vorher irgendeine Substanz an das Wasser abgegeben hatten, die er *Agglutinin* nannte. Jahrzehnte später entdeckte

man, dass es sich dabei um ein Peptid aus 14 Aminosäuren handelt. Inzwischen ist bekannt, dass jede Seeigelart, jeder Seestern, ja vermutlich jede Meerestierspezies, die ablaicht, ihr ganz eigenes *Agglutinin* besitzt. Bei der menschlichen Befruchtung gibt es dieses chaotische Getümmel von Spermien unterschiedlicher Spezies ja nicht. Sie findet – wenn nicht ausnahmsweise *in vitro* – innerhalb des Körpers statt. Bedarf es da überhaupt einer *Chemotaxis*? „Offenbar ja, aber nur in einem engen Bereich um das Ei herum“, sagt Strünker. „Sozusagen zur Feinsteuerung auf den allerletzten Millimetern.“ Doch dazu später mehr.

Zurück zum Seeigel: Um dem kompletten biochemischen Mechanismus der *Chemotaxis* von *Arbacia* auf die Schliche zu kommen,



bedurfte es einiger Tricks, Raffinesse und der Zusammenarbeit von Physikern, Chemikern und Biologen. Am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP) in Berlin wird das kleine Peptid inzwischen künstlich hergestellt, von dem Chemiker Michael Beyermann. Sobald er es aufgereinigt hat, bekommt es von seinem Kollegen Volker Hagen eine „Tarnkappe“ aufgesetzt – eine kleine chemische Schutzgruppe, die das Peptid biologisch inaktiv macht, aber durch einen UV-Blitz leicht abzuspalten ist, von den Forscher auch *caged compound* genannt.

Im „chemischen Käfig“ festgesetzt werden dann bei caesar Peptid und Seeigel-Spermien in einer flachen Messkammer gemischt und unter dem Mikroskop mit einer Kamera beobachtet. Noch schwimmen die Spermien – erkennbar an ihren hellen Köpfen – mehr oder weniger regellos in ihrem Swimmingpool; anders als im Meer paddeln sie in der flachen Küvette lediglich im Kreis, was die Beobachtung erleichtert. Über eine Streifen-, Punkt- oder Micky-Maus-Maske – hier lassen die Forscher ihrem Spieltrieb freien Lauf – wird dann die Kammer mit einem UV-Blitz belichtet. Die Tarnkappen fallen ab und der Lockstoff ist aktiv.

Blitzschnell bewegen sich die Spermien zu der künstlichen Lockstoffquelle hin und bilden so das jeweilige Muster der Maske ab. Dabei folgt ihre Schwimmbahn winzigen Kreisen, die sich immer mehr zur Quelle hin verschieben. Die intrazelluläre Calciumkonzentration lässt sich sogar live verfolgen, wenn die Spermien mit einem Fluoreszenzfarbstoff beladen sind, der durch Calcium aktiviert wird: Periodisch leuchten die rotierenden Spermien auf – je

mehr Calcium, desto heller.

Kreislauf aus Messen, Auswerten und Navigieren

Theoretische Physiker am Max-Planck-Institut für Physik komplexer Systeme in Dresden haben ein Modell dafür entwickelt: Die kreisförmige Schwimmbahn der Spermien führt zu einer periodischen Stimulation, die – mit einer Phasenverschiebung – in ein oszillierendes Calciumsignal umgewandelt wird. Die Spermien schwimmen im Kreis und messen dabei quasi die Lockstoffkonzentration. Dafür benötigt das Spermium etwa einen halben Kreislauf.

Während sie ihre Messung auswerten – gemessen wird keine absolute Konzentration, sondern deren zeitliche Änderung – schwimmen sie einen weiteren Halbkreis. Schlussendlich löst dann ein Anstieg in der intrazellulären Calciumkonzentration eine kombinierte Verhaltensantwort aus: eine starke Biegung der Kreisbahn (*turn*) gefolgt von einem Abschnitt geraden Schwimmens (*run*). Anschließend geht's wieder zurück in den Kreis und es wird erneut gemessen, ausgewertet, navigiert – *turn and run, turn and run* – immer weiter den Gradienten hinauf bis zum Ei.

Der Lockstoffrezeptor in der Spermienmembran, das Enzym Guanylatzyklase, war bereits bekannt. Der Signalweg, der die Änderung des Schwimmverhaltens bewirkt, wurde von Kaupps Team aufgeklärt: Bindet ein Lockstoffmolekül an den Rezeptor, so wandelt besagtes Enzym GTP (Guanosintriphosphat) in den intrazellulären Botenstoff cGMP um. Zyklisches Guaninmonophosphat sei übrigens

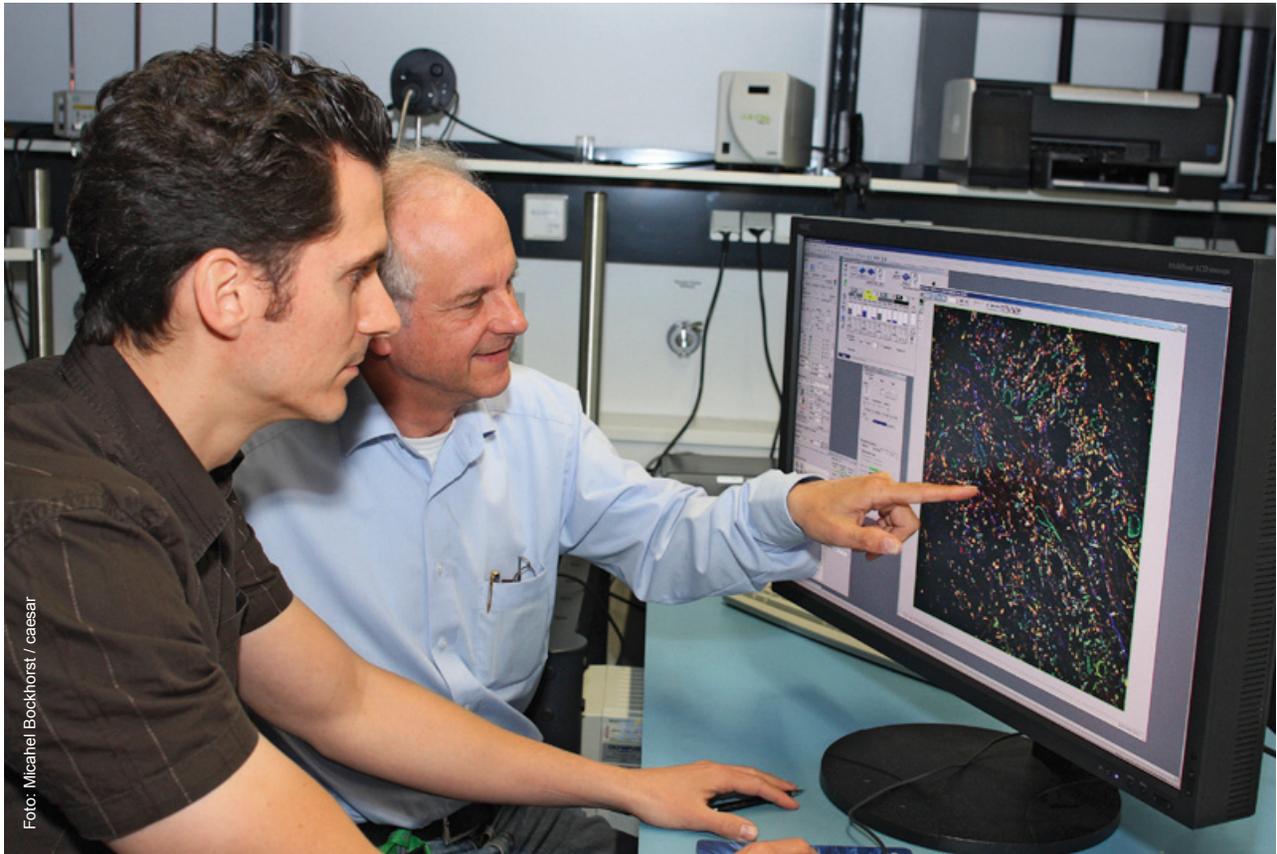


Foto: Michael Bockhorst / caesar

Abbildung 4: Durchblick im Durcheinander. Benjamin Kaupp und Timo Strünker betrachten in Hirnschnitten Antikörperfärbungen von Schrittmacher-Ionenkanälen, die sich auch in Spermien finden.

auch in den Sehzellen der entscheidende Botenstoff, ergänzt Kaupp.

Das cGMP öffnet Kaliumkanäle (CNGK), durch die positiv geladene Kalium-Ionen aus der Zelle hinausströmen. Dadurch wird das Zellinnere natürlich negativer und das Membranpotenzial sinkt, das heißt, die Membran wird hyperpolarisiert. Und das führt zur Öffnung der eingangs erwähnten Schrittmacher-Kanäle – „Beim Herzmuskel sorgen genau diese Schrittmacher-Kanäle für die rhythmischen Kontraktionen“, wirft Kaupp ein – Natrium strömt nun in die Zelle ein, und das Membranpotenzial steigt wieder

an. Die mit dieser Depolarisation verbundene Öffnung von Calcium-Kanälen lässt schließlich Calcium-Ionen einströmen, wodurch sich das Schlagmuster des Flagellums ändert und damit die Schwimmbahn des Spermiums.

Wie die Forscher feststellten, reagieren die Spermien bereits auf einzelne Lockstoffmoleküle. Ein einziger aktivierter Rezeptor reicht aus! Es war ein hartes Stück Arbeit, dies Schritt für Schritt durch Versuch und Gegenversuch herauszufinden. „Ohne die optischen Schalter, darunter auch *caged*-Signalstoffe, wäre das gar nicht möglich gewesen“, betont Timo Strünker.



Und wie läuft das Ganze beim Menschen ab? „Darüber wissen wir immer noch wenig. Fest steht, dass wohl vieles anders ist“, so Strücker. Und das beginnt damit, dass unsere Spermien keine Helix schwimmen, sondern nur geradeaus. Es scheint auch mehr ein gleitendes Schwimmen an einer Oberfläche zu sein, dem Eileiter-Epithel – durch ein viskoses Medium also, nicht vergleichbar mit dem freien Schwimmen im Meerwasser.

Beim Mensch kommt hinzu, dass immer nur etwa 10 bis 20 Prozent der Spermien in einem Ejakulat gleichzeitig in der Lage sind, zur Eizelle vorzudringen – was ihre Beobachtung schwierig macht. Aber auch menschliche Spermien werden angelockt. Tropft man zu Spermien Follikelflüssigkeit, so schwimmen sie darauf zu. „Aber weder Rezeptor noch intrazelluläre Signalstoffe oder ein Lockstoff konnten bisher identifiziert werden.“ Es gibt auch Forscher, die eher an *Thermotaxis* glauben, da innerhalb des Eileiters eine Temperaturdifferenz von 1,6 bis 1,8 Grad Celsius herrscht.

Ein Steroidhormon als Lockstoffkandidat

Aber folgen unsere Spermien denn nicht dem Maiglöckchenduft Bourgeonal, wie Hanns Hatt aus Bochum behauptet? Kaupp wiegt den Kopf: „Nach dem, was wir vom Seeigel wissen, haben wir Zweifel. Sicher ist, dass bei beiden eine Änderung der Calcium-Konzentration die Motilität der Spermien steuert.“ Die menschlichen Spermien wurden in den Versuchen Bourgeonal-Konzentrationen von einigen Mikromol (ein Millionstel Mol) pro Liter ausgesetzt – die Spermien des Seeigels reagieren aber bereits auf femtomolare

Konzentrationen (ein Billiardstel Mol pro Liter). Nicht getestet hat das Bochumer Team, ob Bourgeonal die Bildung intrazellulärer Botenstoffe anregt. Bei caesar tat man es – und es passierte nichts.

Eine japanische Gruppe habe zudem gefunden, dass es bei Mäusen ein anderer Duftstoff sei. An beiden Arbeiten zweifelt Kaupp. „Da es viele Substanzen gibt, die Calcium-Veränderungen in Spermien bewirken, haben wir den Verdacht, dass das alles lipophile, also fettlösliche Verbindungen sind, die direkt in die Membran reingehen können. Möglicherweise sind die Beobachtungen experimentelle Artefakte.“

Aber was lockt dann unsere Spermien an? „Es gibt einige Kandidaten.“ Kaupp hält sich etwas bedeckt. „Man vermutet, dass es das Progesteron sein könnte.“ Das Steroidhormon wird nachweislich von den Cumuluszellen der Eizelle abgegeben. Normalerweise reguliert Progesteron im Körper Vorgänge über die Proteinsynthese, und das braucht Minuten bis zu Tagen.

Reife Spermien stellen aber keine Proteine mehr her – wozu auch? Progesteron kann aber auch eine schnelle Wirkung ausüben: Innerhalb von Sekunden reagieren Spermien darauf mit einem intrazellulären Calcium-Signal. „Wir machen derzeit Tests mit *caged*-Progesteron.“

Schwachstelle im Fruchtbarkeitstest

Da es beim Menschen so kompliziert ist: Gibt es andere Säugetiermodelle? „Ja, Ratten, Mäuse und Kaninchen. Wir haben früher auch mit Kaninchen gearbeitet“, erzählt Kaupp. Heute wird bei caesar jedoch an

frischen menschlichen Spermien geforscht, wozu das Institut ein kleines Netzwerk aus freiwilligen Spendern aufgebaut hat. Manche Wissenschaftler behaupten, dass die Lockstoffe von Mensch, Kaninchen und Maus identisch seien. „Wir wissen, dass die Follikelflüssigkeit von Frauen auch Kaninchenspermien anzieht“, bestätigt Kaupp. „Das hat auch eine gewisse Logik: Der Seeigel entlässt seine Gameten ins Meer und überlässt sie ihrem Schicksal. Da ist *Chemotaxis* immens wichtig! Beim Säugetier, wo Sexualität vorgeschaltet ist, muss keine Spezifität des Erkennens über den Lockstoff erfolgen.“ Beim sogenannten Hamstertest, der das Fertilisierungspotenzial menschlicher Spermien prüft, macht man sich dies zunutze: Wenn die Spermien eines Mannes in der Lage sind, in Eizellen eines Hamsters einzudringen, gilt das als Hinweis auf eine intakte Spermienfunktion.

Timo Strünker hat allerdings seine Zweifel, denn der Test hat einen Schwachpunkt: An Knock-out-Mäusen hat man festgestellt, dass Tiere, denen ein bestimmter, nur in Spermien vorkommender Calcium-Kanal fehlt, zwar qietschfidel sind – aber unfruchtbar. Ihre Spermien können die Eihülle nicht durchdringen. „Beim Hamstertest wird jedoch vorher die Eihülle entfernt. Und heute weiß man, dass es auch Menschen gibt, die einen Defekt in diesem Kanal haben“. Damit wird klar, welche Anwendung die Grundlagenforschung bei caesar einmal finden könnte. Zum Beispiel um Paaren mit Fruchtbarkeitsstörungen zu helfen – diagnostisch und vielleicht sogar therapeutisch. Bestimmte Ionenkanäle, Pumpen und Transporter kommen zudem nur in Spermien

vor. Diese Proteine sind ideale Zielstrukturen, neudeutsch Targets genannt, für selektive Kontrazeptiva. Endlich doch die „Pille für den Mann“! Und für technische Sensoren, die einzelne Moleküle in einem Gemisch aus Milliarden anderen herausfinden könnten, gäbe es natürlich auch Verwendung. Benjamin Kaupp reizt an seiner Arbeit jedoch etwas anderes: die evolutionären Zusammenhänge. „Riechen, Sehen, die Chemosensorik in den Spermien – das ist für mich die Variation eines Themas. Wie wurde es abgewandelt, um so unterschiedliche Funktionen zu erfüllen?“

Hummer entschädigt für die Arbeit im Dunkeln

Derzeit bereitet sich das Team wieder auf eine Reise an die Ostküste der USA vor. Messgeräte werden verpackt und verschifft, denn man will – wie jeden Sommer – gemeinsam mit vielen anderen Forschern aus aller Welt drei Monate lang im legendären, 1888 gegründeten meeresbiologischen Laboratorium in Woods Hole arbeiten. Zurück zu den Wurzeln, nach Cape Cod, wo einst die *Chemotaxis* beim Seeigel entdeckt wurde.

Es muss fantastisch sein, in einer so malerischen Gegend zu arbeiten, oder? „Na ja“, winkt Timo Strünker ab, „davon sehen wir nicht viel. Da die *caged compounds* extrem lichtempfindlich sind, arbeiten wir stundenlang im Dunkeln.“ Kein Grund für Mitleid! Zum Ausgleich gibt's fangfrischen Hummer zum Dinner. Und dazu den Blick auf einen gigantischen Ozean, dessen seltsame Bewohner bis heute größtenteils unerforscht sind.



Glossar

Extrakorporal

Außerhalb des Körpers befindlich.

Chemotaxis

Bezeichnet eine auf einen chemischen Reiz hin gerichtete Bewegung innerhalb eines chemischen Gradienten. Bei positiver *Chemotaxis* erfolgt die Bewegung in Richtung des Lockstoffs; negative *Chemotaxis* führt zu einem gezielten Entfernen von der Reizquelle (Schreckstoff).

Helix

Eine Schraube, die sich mit konstanter Steigung um den gedachten Mantel eines Zylinders windet.

Ionenkanäle

Poren bildende, die Zellmembran durchspannende Proteine, die elektrisch geladenen Teilchen, sogenannten Ionen, das Durchqueren der Membran ermöglichen.

Flagellum

Auch Geißel genannt; langes, fadenförmiges Gebilde, das der Bewegung dient.

caged compound

Ein biologisch relevantes Molekül, das aufgrund einer angehängten chemischen Schutzgruppe (*cage*) inaktiv ist. Die Verbindung ist photolabil und kann durch Lichtblitze entsprechender Wellenlänge wieder gelöst werden, wodurch das Molekül in einen aktiven Zustand versetzt wird.

Membranpotenzial

Die elektrische Spannung, die zwischen der Innen- und Außenseite einer Biomembran anliegt.

Folikelflüssigkeit

Flüssigkeit in den Eibläschen, in denen das befruchtungsfähige Ei heranreift.

Mol

Ein Mol (mol) besteht aus $6,022 \cdot 10^{23}$ Teilchen eines bestimmten Stoffs.





Publikationen 2008

Albert, T.; Egler, C.; Jakushev, S.; Schuldenzucker, U.; Schmitt, A.; Brokemper, O.; Zabe-Kühn, M.; Hoffmann, D.; Oldenburg, J.; Schwaab, R.;

The B-cell epitope of the monoclonal anti-factorVIII antibody ESH8 characterized by peptide array analysis.

[Artikel] Thrombosis and Haemostasis **99** (3), 634-637 (2008)

Bechtold, C.; Gerber, A.; Wuttig, M.; Quandt, E.;

Magnetoelastic hysteresis in 5 M NiMnGa single crystals.

[Artikel] Scripta Materialia **58** (11), 1022-1024 (2008)

Buschbeck, J.; Heczko, O.; Ludwig, A.; Fahler, S.; Schultz, L.;

Magnetic properties of epitaxial Fe-Pd films measured at elevated temperatures.

[Artikel] Journal of Applied Physics **103** (7), 07B334 (2008)

Büsgen, T.;

Nasschemische Synthese dotierter Zinkoxidnanostäbchen.

[Dissertation] Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn (2008)

Büsgen, T.; Hilgendorff, M.; Irsen, S.; Wilhelm, F.; Rogalev, A.; Goll, D.; Giersig, M.;

Colloidal cobalt-doped ZnO nanorods: Synthesis, structural, and magnetic properties.

[Artikel] Journal of Physical Chemistry C **112** (7), 2412-2417 (2008)

Chatterjee, M.; Rancso, C.; Stuhmer, T.; Eckstein, N.; Andrulis, M.; Gerecke, C.; Lorentz, H.; Royer, H. D.; Bargoul, R. C.;

The Y-box binding protein YB-1 is associated with progressive disease and mediates survival and drug resistance in multiple myeloma.

[Artikel] Blood **111** (7), 3714-3722 (2008)

Degistirici, Ö.; Jäger, M.; Knipper, A.;

Applicability of cord blood-derived unrestricted somatic stem cells in tissue engineering concepts.

[Artikel] Cell Proliferation **41** (3), 421-440 (2008)

Degistirici, Ö.; Gräbellus, F.; Irsen, S.; Schmid, K. W.; Thie, M.;

Osteogenic differentiation of human dental neural crest-derived progenitor cells: a model for developing bone.

[Artikel] Tissue Engineering Part A **14** (5), 766-766 (2008)

Degistirici, Ö.; Jaquiere, C.; Schönebeck, B.; Siemonsmeier, J.; Goetz, W.; Martin, I.; Thie, M.;

Defining properties of neural crest-derived progenitor cells from the apex of human developing tooth.

[Artikel] Tissue Engineering Part A **14** (2), 317-U58 (2008)

Eckstein, N.; Servan, K.; Girard, L.; Cai, D.; Jonquieres, G. v.; Jaehde, U.; Kassack, M. U.; Gazdar, A. F.; Minna, J. D.; Royer, H. D.;

Epidermal growth factor receptor pathway analysis identifies amphiregulin as a key factor for cisplatin resistance of human breast cancer cells.

[Artikel] Journal of Biological Chemistry **283** (2), 739-750 (2008)

Fierz, F. C.; Beckmann, F.; Huser, M.; Irsen, S.; Leukers, B.; Witte, F.; Degistirici, Ö.; Andronache, A.; Thie, M.; Müller, B.;

The morphology of anisotropic 3D-printed hydroxyapatite scaffolds.

[Artikel] Biomaterials **29** (28), 3799-3806 (2008)

Firkowska, I.; Godehardt, E.; Giersig, M.;

Interaction Between Human Osteoblast Cells and Inorganic Two-Dimensional Scaffolds Based on Multiwalled Carbon Nanotubes: A Quantitative AFM Study.

[Artikel] Advanced Functional Materials **18** (23), 3765-3771 (2008)

Gluz, O.; Kates, R.; Schmitt, M.; Mengele, K.; Royer, H. D.; Diallo-Danebrock, R.; Ting, E.; Mohrmann, S.; Schuett, G.; Poremba, C.; Nitz, U.; Harbeck, N.;

Expression of YB-1 protein and effectiveness of the dose-increase with high risk-breast cancer: 5-years of findings of the WSG-AM-01 study.

[Artikel] Onkologie **31**, 34-34 (2008)

Gosepath, E. M.; Eckstein, N.; Hamacher, A.; Servan, K.; Jonquieres, G. v.; Lage, H.; Gyoerffy, B.; Royer, H. D.; Kassack, M. U.;

Acquired cisplatin resistance in the head-neck cancer cell line Cal27 is associated with decreased DKK1 expression and can partially be reversed by overexpression of DKK1.

[Artikel] International Journal of Cancer **123** (9), 2013-2019 (2008)

Hamann, S.; Ehmann, M.; Thienhaus, S.; Savan, A.; Ludwig, A.;

Micro-hotplates for high-throughput thin film processing and in situ phase transformation characterization.

[Artikel] Sensors and Actuators A-Physical **147** (2), 576-582 (2008)

Harzheim, D.; Pfeiffer, K. H.; Fabritz, L.; Kremmer, E.; Buch, T.; Waisman, A.; Kirchhof, P.; Kaupp, U. B.; Seifert, R.;

Cardiac pacemaker function of HCN4 channels in mice is confined to embryonic development and requires cyclic AMP.

[Artikel] Embo Journal **27** (4), 692-703 (2008)

Imperia, P.; Kandulski, W.; Kosiorek, A.; Glaczynska, H.; Maletta, H.; Giersig, M.;

Magnetic anisotropy study of triangular-shaped Co nanostructures.

[Artikel] Journal of Magnetism and Magnetic Materials **320** (21), 2682-2687 (2008)

Jonquieres, G. v.;

Funktionelle Analyse von YB-1 Interaktionen.

[Dissertation] Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn (2008)



Kalska, B.; Fumagalli, P.; Hilgendorff, M.; Giersig, M.;

Co/CoO core-shell nanoparticles-Temperature-dependent magneto-optic studies.

[Artikel] Materials Chemistry and Physics **112** (3), 1129-1132 (2008)

Kaupp, U. B.; Kashikar, N. D.; Weyand, I.;

Mechanisms of sperm chemotaxis.

[Artikel] Annual Review of Physiology **70**, 93-117 (2008)

Löbel, R.; Thienhaus, S.; Savan, A.; Ludwig, A.;

Combinatorial fabrication and high-throughput characterization of a Ti-Ni-Cu shape memory thin film composition spread.

[Artikel] Materials Science and Engineering A-Structural Materials Properties Microstructure and Processing **481** (Sp. Iss. SI), 151-155 (2008)

Ludwig, A.; Zarnetta, R.; Hamann, S.; Savan, A.; Thienhaus, S.;

Development of multifunctional thin films using high-throughput experimentation methods.

[Artikel] International Journal of Materials Research **99** (10), 1144-1149 (2008)

Mischkowski, R. A.; Scherer, P.; Ritter, L.; Neugebauer, J.; Keeve, E.; Zoller, J. E.;

Diagnostic quality of multiplanar reformations obtained with a newly developed cone beam device for maxillofacial imaging.

[Artikel] Dentomaxillofacial Radiology **37** (1), 1-9 (2008)

Muktiono, B.; Schulten, C.; Heemken, O.; Gandrass, J.; Prange, A.; Schnabel, H.; Cerboncini, C.;

Isolation and purification assay of ex vivo photosystem II D1 protein toward integrated biointeraction analysis.

[Artikel] Analytical Bioanalytical Chemistry **390** (4), 1195-1202 (2008)

Müller, M.; Olek, M.; Giersig, M.; Schmitz, H.;

Micromechanical properties of consecutive layers in specialized insect cuticle: the gula of Pachnoda marginata (Coleoptera, Scarabaeidae) and the infrared sensilla of Melanophila acuminata (Coleoptera, Buprestidae).

[Artikel] Journal of Experimental Biology **211** (16), 2576-2583 (2008)

Pazos-Perez, N.; Baranov, D.; Irsen, S.; Hilgendorff, M.; Liz-Marzan, L. A.; Giersig, M.;

Synthesis of flexible, ultrathin gold nanowires in organic media.

[Artikel] Langmuir **24** (17), 9855-9860 (2008)

Reifarth, J.;

Nicht zu vergessen : Der Demenz- und Altersforschung kommt vor dem Hintergrund des demographischen Wandels in Deutschland eine wichtige Rolle zu.

[Artikel] Frankfurter Allgemeine Zeitung **17.11.2008** (2008)

Treitz, G.; Gronewold, T. M. A.; Quandt, E.; Zabe-Kühn, M.;

Combination of a SA-W-biosensor with MALDI mass spectrometric analysis.

[Artikel] Biosensors & Bioelectronics **23** (10), 1496-1502 (2008)



Tröger, C.; Bens, A.; Bermes, G.; Klemmer, R.; Lenz, J.; Irsen, S.;

Ageing of acrylate-based resins for stereolithography: Thermal and humidity ageing behaviour studies.

[Artikel] Rapid Prototyping Journal **14** (5), 305-317 (2008)

Weckmann, A.; Egler, C.;

Utilization of Bacteriophages as Molecular Label.

[Artikel] Journal of Nanoscience and Nanotechnology **8** (8), 3988-3989 (2008)

Zamponi, C.; Rumpf, H.; Schmutz, C.; Quandt, E.;

Structuring of sputtered superelastic NiTi thin films by photolithography and etching.

[Artikel] Materials Science and Engineering A-Structural Materials Properties Microstructure and Processing **481**, 623-625 (2008)

Zotov, N.; Ludwig, A.;

First-principles calculations of the elastic constants of Fe-Pt alloys.

[Artikel] Intermetallics **16** (1), 113-118 (2008)

Zotov, N.; Feydt, J.; Ludwig, A.;

Dependence of grain sizes and microstrains on annealing temperature in Fe/Pt multilayers and L1(0) FePt thin films.

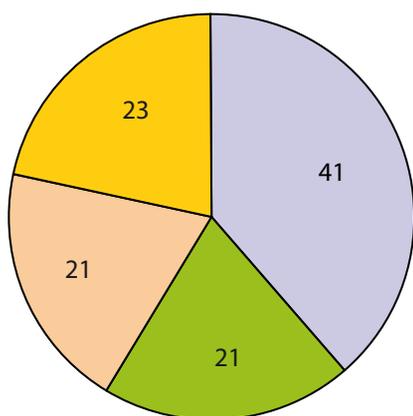
[Artikel] Thin Solid Films **517** (2), 531-537 (2008)



Personal / Finanzen

Mitarbeiterstruktur

Bei der Stiftung caesar waren Ende 2008 insgesamt 106 Mitarbeiter angestellt.



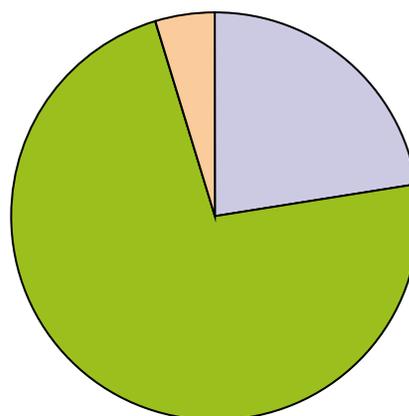
- Mitarbeiter in wissenschaftlichen Abteilungen und Gruppen
- Verwaltung (Finanzen/Controlling, Einkauf, Recht/Personal, Presse)
- Infrastruktur (Facility Management, Werkstatt, IT, Bibliothek)
- Auszubildende/ Praktikanten/ Studenten/ Gäste

Personalentwicklung

Die Personalentwicklung bei caesar war durch die Neuausrichtung des Forschungszentrums geprägt, sodass 2008 eine starke Fluktuation herrschte. Während zahlreiche Mitarbeiter aus auslaufenden Arbeitsgruppen caesar verließen, wurden 22 Wissenschaftler für den Bereich Neurowissenschaften eingestellt. Mitarbeiter in den Laboren und in den Servicebereichen wurden verstärkt für die Aufgaben im Rahmen der wissenschaftlichen Neuausrichtung geschult.

Vermögen der Stiftung

Die Bundesrepublik Deutschland und das Land Nordrhein-Westfalen statteten caesar mit einem Stiftungskapital in Höhe von 383,4 Mio € aus. Von der Stadt Bonn erhielt die Stiftung weitere 6,6 Mio € im Zuge des Grundstückserwerbes. Aus dem Kapital wurde das Gebäude und die Erstausrüstung des Forschungszentrums finanziert. Die Stiftung hat 286,3 Mio € des Stiftungskapitals langfristig am Kapitalmarkt angelegt. Mit den Erträgen wird die Forschung finanziert.

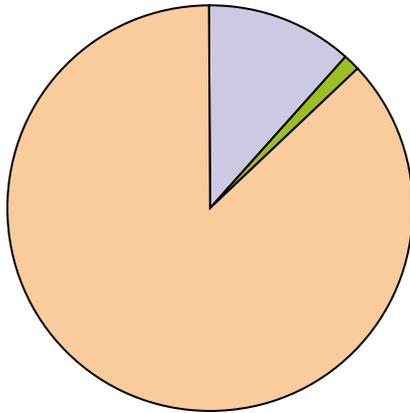


- Sachanlagen
- Finanzanlagen
- Sonstige

Sachanlagen	89.049.818 €
Finanzanlagen	289.454.226 €
Sonstige	18.294.023 €
Bilanzsumme	396.798.067 €

Erträge

Die Erträge im Jahr 2008 teilen sich wie folgt auf:

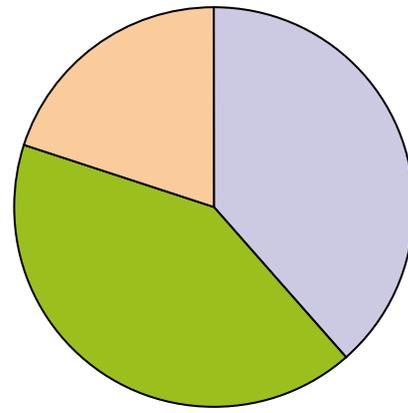


- Umsatzerlöse
- Erträge aus Förderprojekten
- Erträge aus Wertpapieren und Zinsen

Umsatzerlöse	1.721.467 €
Erträge aus Förderprojekten	204.034 €
Erträge aus Wertpapieren und Zinsen	12.887.421 €
Erträge insgesamt	14.812.922 €

Aufwendungen

Für 2008 ergeben sich die folgenden Aufwendungen:



- Personalaufwand
- Sachaufwand
- Abschreibungen

Personalaufwand	5.280.915 €
Sachaufwand	5.680.086 €
Abschreibungen	2.733.794 €
Aufwendungen insgesamt	13.694.795 €

Jahresbilanz 2008

Abschluss zum 31. Dezember 2008 (Angaben in €)

Aktiva	31.12.08	31.12.07
A. Anlagevermögen		
I. Immaterielle Vermögensgegenstände	80.390	68.124
II. Sachanlagen		
Grundstücke & Bauten *)	71.464.250	71.337.987
Andere Anlagen	17.518.644	19.035.388
Geleistete Anzahlungen & Anlagen im Bau	66.924	58.552
Summe aus II.	89.049.818	90.431.927
III. Finanzanlagen		
Beteiligungen	227.142	77.142
Wertpapiere des Anlagevermögens zur Anlage des Stiftungsvermögen	287.698.307	287.698.307
Wertpapiere des Anlagevermögens zur Gebäudewiederbeschaffung	1.528.777	749.884
Summe aus III.	289.454.226	288.525.333
Summe für A.	378.584.434	379.025.383
B. Umlaufvermögen		
I. Vorräte	226.495	388.577
II. Forderungen und sonstige Vermögensgegenstände		
Forderungen aus Lieferungen und Leistungen	192.429	752.543
Forderungen gegen Unternehmen, mit denen ein Beteiligungsverhältnis besteht	518.965	0
Sonstige Vermögensgegenstände	1.854.388	1.121.984
Summe aus II.	2.565.782	1.874.527
III. Wertpapiere	10.221.300	8.973.750
IV. Kassenbestand, Bundesbankguthaben, Guthaben bei Kreditinstituten und Schecks	4.973.381	4.999.294
Summe für B.	17.986.958	16.236.148
C. Rechnungsabgrenzungsposten	226.675	227.202
Gesamtes Vermögen	396.798.067	395.488.733

*) § 253 Abs. 2 HGB wird nicht angewendet. Stattdessen wird eine Instandhaltungsrücklage gebildet.



Passiva	31.12.08	31.12.07
A. Eigenkapital		
I. Stiftungsvermögen		
Finanzierungskapital	286.323.453	286.323.453
Investitionskapital	97.145.457	97.145.457
Zustiftung Stadt Bonn	6.681.051	6.681.051
Zuführung Rücklagen	1.283.957	1.283.957
Summe aus I.	391.433.918	391.433.918
II. Rücklagen		
Freie Rücklage gemäß § 58 Nr. 7a AO	1.654.060	1.963.179
III. Ergebnis		
Jahresüberschuss/- Fehlbetrag	1.118.127	-309.119
Summe für A.	394.206.105	393.087.978
B. Rückstellungen		
Instandhaltungsrücklage *)	1.443.800	949.800
Sonstige Rückstellungen	136.254	160.018
Summe für B.	1.580.054	1.109.818
C. Verbindlichkeiten		
Verbindlichkeiten aus Lieferungen und Leistungen	495.754	961.443
Sonstige Verbindlichkeiten	512.852	306.423
Summe für C.	1.008.606	1.267.866
D. Rechnungsabgrenzungsposten	3.302	23.071
Gesamtes Vermögen	396.798.067	395.488.733



Organe der Stiftung

Stiftungsrat

Zum 31.12.2008 war der Stiftungsrat wie folgt zusammengesetzt:

Prof. Dr. Peter Gruss, Präsident der Max-Planck-Gesellschaft (MPG)
Vorsitzender

Prof. Dr. Herbert Jäckle, Vizepräsident der Max-Planck-Gesellschaft (MPG)
stellvertretender Vorsitzender

Prof. Dr. Ulrich Hartl, Max-Planck-Institut für Biochemie

Prof. Dr. Florian Holsboer, Max-Planck-Institut für Psychatrie

Prof. Dr. Wieland B. Huttner, Max-Planck-Institut für molekulare Zellbiologie und Genetik

Prof. Dr. Martin Stratmann, Max-Planck-Institut für Eisenforschung GmbH

Prof. Dr. Joachim Spatz, Max-Planck-Institut für Metallforschung

Prof. Dr. Heinz Wässle, Max-Planck-Institut für Hirnforschung

Staatssekretär Prof. Dr. Frieder Meyer-Krahmer, Bundesministerium für Bildung und
Forschung

Dr. Stephan Eisel, Mitglied des Deutschen Bundestages

Staatssekretär Dr. Michael Stückradt, Ministerium für Innovation, Wissenschaft, Forschung
und Technologie des Landes Nordrhein-Westfalen

Helmut Stahl, Mitglied des Landtages von Nordrhein-Westfalen

Prof. Dr. Andreas Barner, Boehringer Ingelheim GmbH

Bärbel Dieckmann, Oberbürgermeisterin der Stadt Bonn

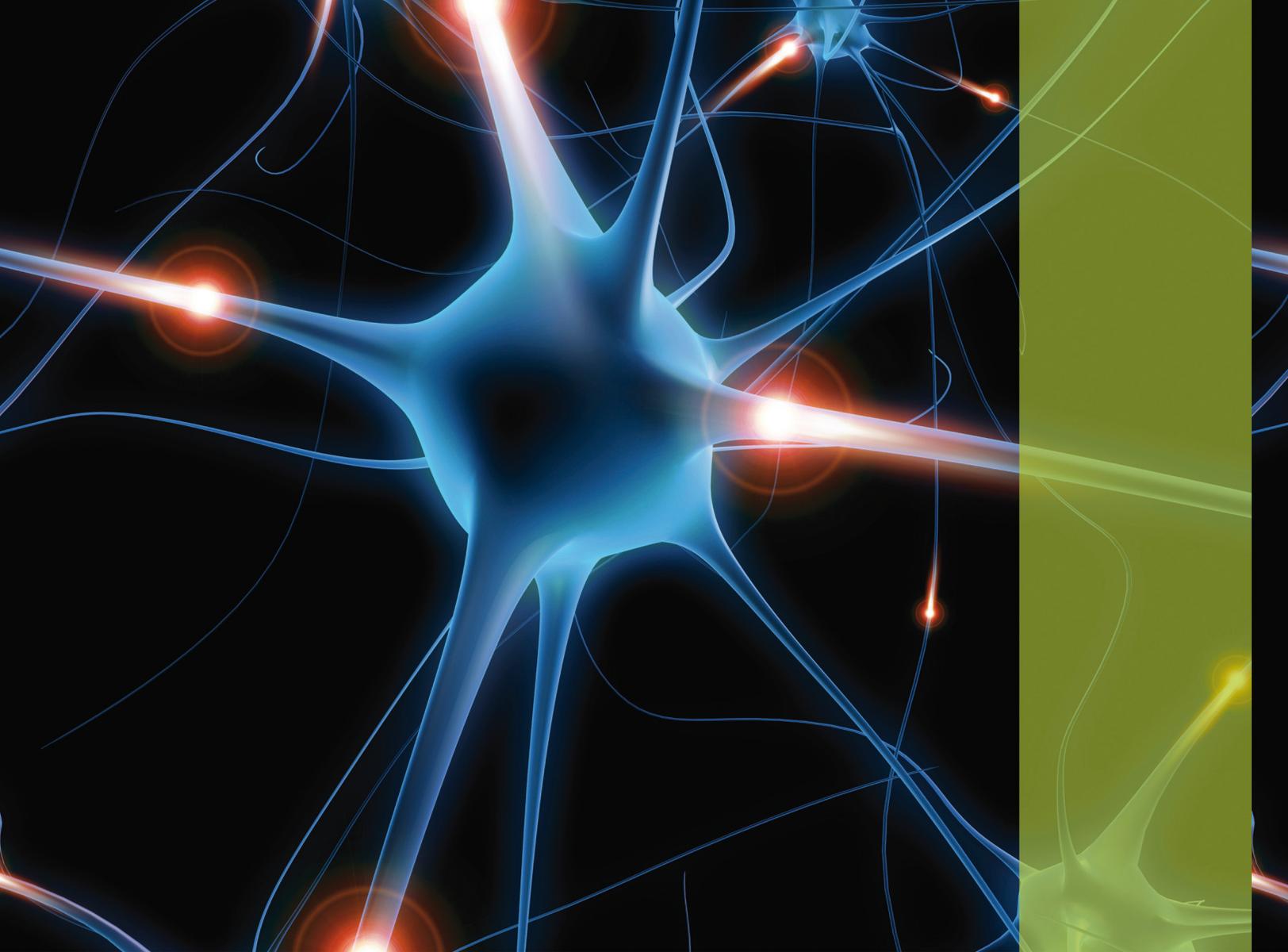
Prof. Dr. Matthias Winiger, Rektor der Universität Bonn

Vorstand

Zum 31.12.2008 war der Vorstand wie folgt zusammengesetzt:

Prof. Dr. Ulrich B. Kaupp, Wissenschaftlicher Direktor

Dr. Hartwig Bechte, Kaufmännischer Direktor



caesarium

Forschungszentrum caesar, Hörsaal

Donnerstag, 30.10.2008, 19 h

„Die junge Wissenschaft der Biologie des Alterns“

Prof. Dr. Jens Brüning

Institut für Genetik

Zentrum der Molekularen Medizin der Universität zu Köln
(ZMMK)

Donnerstag, 13.11.2008, 19 h

**„Wer reagiert im Kopf? Philosophische Implikationen der
Hirnforschung“**

Prof. Dr. Wolf Singer

Abteilung Neurophysiologie

Max-Planck-Institut für Hirnforschung, Frankfurt

caesar



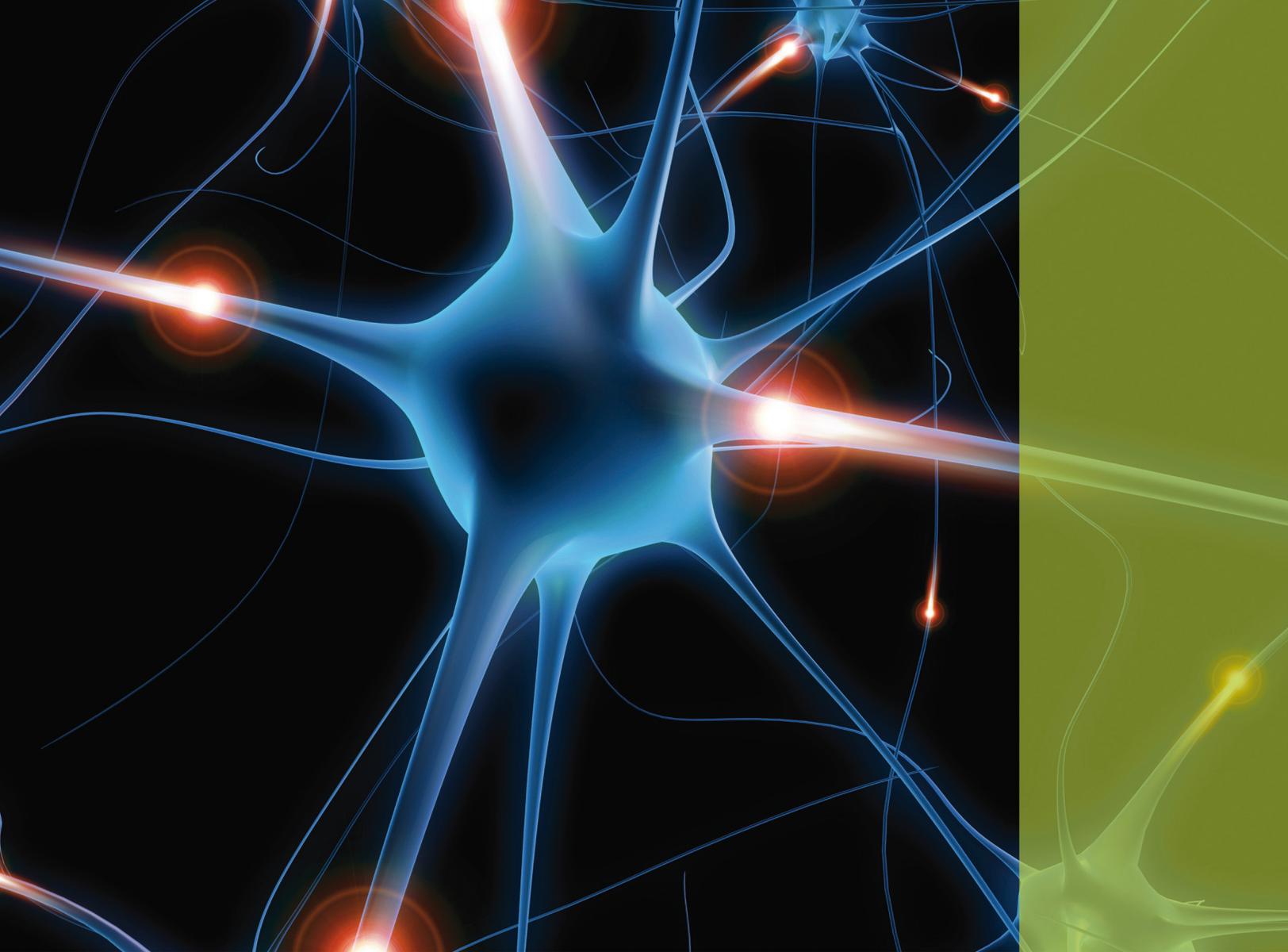
center of advanced
european studies
and research

www.caesar.de

Forschungszentrum caesar
Ludwig-Erhard-Allee 2
53175 Bonn



Stiftung caesar -
assoziiert mit der
Max-Planck-Gesellschaft



caesarium

Forschungszentrum caesar, Hörsaal

Donnerstag, 29.05.2008, 19 h

**„Frauengehirn, Männergehirn: Fakten und Mythen zu
einer sehr alten Frage“**

Prof. Dr. Onur Güntürkün

Institut für Kognitive Neurowissenschaft
Ruhr-Universität Bochum

caesar



center of advanced
european studies
and research

www.caesar.de

Forschungszentrum caesar
Ludwig-Erhard-Allee 2
53175 Bonn



Stiftung caesar -
assoziiert mit der
Max-Planck-Gesellschaft

caesar



center of advanced
european studies
and research

Jahresbericht 2008



Herausgeber Stiftung caesar
Ludwig-Erhard-Allee 2
D-53175 Bonn

Redaktion und Konzept Prof. Dr. U. Benjamin Kaupp
Dr. Jürgen Reifarth
Stefan Hartmann

Textlayout und Umschlag Steffen Pattai

© 2009 Stiftung caesar
Ludwig-Erhard-Allee 2
D-53175 Bonn
Tel.: +49 (0)228 9656 - 0
Fax.: +49 (0)228 9656 - 111
E-mail: office@caesar.de
<http://www.caesar.de>

caesar



center of advanced
european studies
and research

Jahresbericht 2008
