Jahresbericht 2009

caesar

center of advanced
european studies
and research

Stiftung caesar -
assoziiert mit der
Max-Planck-Gesellschaft

Inhaltsverzeichnis

Vorwort 7

Forschungsberichte
Dagmar Wachten (geb. Harzheim)
Dr. Jekyll und Mr. Hyde – Die zwei Gesichter des Calciums im Herzen 11

Timo Strünker, U. Benjamin Kaupp
Kontaktanzeige eines Spermiums:
Sensibelchen sucht Eizelle zum Verschmelzen 15

Sebastian Peuker
Ultraschnelles Einfrieren eines Aktivierungsprozesses -
Eine Diashow molekularer Bewegung 21

Bruno Bulic
Neurodegenerative Diseases and Proteopathies 27

Stephan Irsen
KonTEM - Ein neues Phasenkontrastsystem für Transmissionselektronenmikroskope 33

Manfred Lacher
Schalten von Nervenzellen mit Licht - eine neue Methode in der Epilepsieforschung 41

Berichte über abgeschlossene Doktorarbeiten
Annukka Aho
HCN Pacemaker Channels in the Mouse Brain 51

Miriam Krähling
Der Unfruchtbarkeit auf der Spur 55

Astrid Loogen
Wenn man(n) auf Frau hört 59

Publikationen 65

Personal/Finanzen 70

Organe der Stiftung 75

Vorwort

Das Forschungszentrum caesar ist angekommen – als assoziiertes Institut der Max-Planck-Gesellschaft. Bei caesar wird mit den selben Maßstäben und Ansprüchen geforscht wie in einem Max-Planck-Institut. Erste Publikationen zeugen von der wissenschaftlichen Qualität. Auch die Beiträge dieses Jahresberichtes geben einen Einblick in die Fortschritte am Institut.

Forschung lebt von Interaktion und Vernetzung. Für das neu ausgerichtete Institut ist es deshalb besonders wichtig, sich in das wissenschaftliche Umfeld der Region einzubetten.

Ideale Partner finden sich in der Max-Planck-Gesellschaft selbst: etwa die beiden Kölner Max-Planck-Institute für Biologie des Alterns und für neurologische Forschung. An Letzteres werden die wissenschaftlichen Direktoren von caesar personell angebunden.

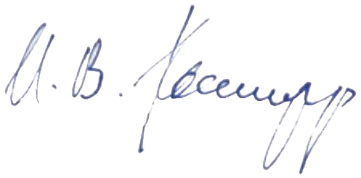
Darüber hinaus besteht eine enge Zusammenarbeit mit der Universität Bonn, die in einem Rahmenvertrag verankert ist und im Konzept der Neuausrichtung des Forschungszentrums als tragende Säule betrachtet wird. In vielen gemeinsamen Projekten nutzen Wissenschaftler die exzellente Infrastruktur der Mikrosystemtechnologie und Elektronenmikroskopie bei caesar. So ist es der Universität dank der Kooperation gelungen, eine wichtige Berufung zum Physikalischen Institut erfolgreich abzuschließen. caesar wiederum kann Nachwuchswissenschaftlern die Möglichkeit für gemeinsame Projekte mit der Bonner Hochschule bieten.

Zweiter wichtiger Kooperationspartner für caesar ist das Deutsche Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen (DZNE). caesar war bereits an der erfolgreichen Bewerbung für Bonn beteiligt. Wie versprochen, arbeitet das DZNE nun in den Räumen von caesar; zunächst hatte es hier seinen Verwaltungssitz, mittlerweile werden Labors genutzt.

Dabei entwickeln caesar und das DZNE eine besondere Form der Kooperation: Es werden gemeinsame Gruppen gegründet, in denen caesar seine Infrastruktur zur Verfügung stellt und das DZNE die Mitarbeiter finanziert. Erstes Beispiel ist die Zusammenarbeit in der Kryo-Elektronenmikroskopie. Eine gemeinsame Forschungsgruppe auf diesem Gebiet stellt ein wichtiges Bindeglied zwischen caesar und dem DZNE dar. Als wissenschaftlicher Leiter konnte Dr. Ashraf Al-Amoudi vom EMBL gewonnen werden. Seine Gruppe nutzt ein erstklassiges Kryo-Elektronenmikroskop, das die herausragende elektronenmikroskopische Kapazität von caesar weiter ausbaut. Als zweites gemeinsames Projekt werden caesar und das DZNE die Max-Planck-Arbeitsgruppe für Strukturelle Molekularbiologie am DESY in Hamburg gemeinsam fortsetzen. In der ersten Jahreshälfte 2011 soll das Team um Prof. Eckhard Mandelkow seine Arbeit im caesar-Gebäude aufnehmen.

Diese Kooperationsbeispiele zeigen, wie sich caesar zu einem wichtigen und anerkannten Partner in der Forschungsregion Köln-Bonn-Aachen entwickelt. caesar setzt eigene Schwerpunkte und verbindet seine wissenschaftliche Arbeit in vielfältiger Weise mit den vorhandenen und stetig wachsenden Kapazitäten in der Region.

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



Prof. Dr. U. Benjamin Kaupp
Wissenschaftlicher Direktor

Gertrud Bilski
Kaufmännische Geschäftsführerin

Forschungsberichte

Dr. Jekyll und Mr. Hyde – Die zwei Gesichter des Calciums im Herzen

Dagmar Wachten (geb. Harzheim)
Molekulare Neurosensorik

Das Herz eines erwachsenen Menschen schlägt im Durchschnitt ca. 50-100 x pro Minute. Es schlägt schneller, wenn wir uns freuen oder Sport treiben, und es schlägt langsamer, wenn wir schlafen. Das alles geschieht unbewusst. Äußere Einflüsse können jedoch dazu führen, dass unser Herz aus dem Takt gerät.

Wir bewegen uns zu wenig und wir essen zu viel. Übergewicht führt dazu, dass ein größerer Druck auf den Blutgefäßen und dem Herzen lastet. Um eine gleichbleibende Durchblutung des Körpers zu gewährleisten, muss das Herz stärker pumpen, wodurch sich der Blutdruck erhöht und das Herz an Masse zunimmt. Eine Größenzunahme durch anhaltenden Bluthochdruck ist ein pathologischer Zustand, der dramatische Auswirkungen haben kann: Die Leistungsfähigkeit des Herzens nimmt ab, das Herz beginnt unrhythmisch zu schlagen, was im schlimmsten Fall zum Herzversagen führt. Wir haben uns mit der Frage beschäftigt, welche Veränderungen auf zellulärer Ebene dazu führen, dass das Herz unter pathologischen Bedingungen an Größe zunimmt und dann aus dem Takt gerät.

Calcium als Taktgeber im Herzen

Zunächst haben wir die Signalverarbeitung in Herzmuskelzellen (ventrikuläre Kardiomyozyten) von neugeborenen Ratten untersucht. Dazu haben wir diese Zellen isoliert und kultiviert. Die Zellen schlagen in Kultur weiter, so dass wir an Einzelzellen den Schlagrhythmus untersuchen können. Ein Stoff, der bei Herz-Kreislauf-Erkrankungen vermehrt gebildet wird und am Größenwachstum des Herzens unter pathologischen Bedingungen beteiligt ist, ist Endothelin-1 (ET-1). ET-1 verengt die Blutgefäße und ist damit an der Regulation des Blutdrucks beteiligt. Gibt man ET-1 zu kultivierten Herzmuskelzellen, schlagen diese nicht nur schneller, sondern nehmen auch an Größe zu [1]. Die Veränderungen auf zellulärer Ebene entsprechen also denen, die man für das gesamte Herz beobachtet. Was passiert nun in der Zelle, wenn sie mit ET-1 stimuliert wird? ET-1 bindet an seine Rezeptoren, wodurch ein wichtiger Botenstoff in der Zelle, das Calcium, aus intrazellulären Speichern freigesetzt wird. Dies hat in Herzmuskelzellen fatale Folgen, da Calcium den Vorgang kontrolliert, der die Zellen kontrahieren lässt, das *excitation-contraction coupling* (ECC). Beim ECC öffnen als Reaktion auf einen elektrischen Reiz spannungsabhängige Calcium-Kanäle (VDCC) in der Plasmamembran der Herzmuskelzellen. Dadurch strömt lokal Calcium in die Zelle ein. Ryanodin-Rezeptoren (RyR) sind ebenfalls Calcium-Kanäle, die sich jedoch in der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums (SR), einem intrazellulären Calcium-Speicher, befinden. Das einströmende Calcium öffnet die RyR, wodurch eine große Menge Calcium aus dem SR freigesetzt wird. Die intrazelluläre Calcium-Konzentration wird drastisch erhöht, worauf die Zelle kontrahiert (Abbildung 1).

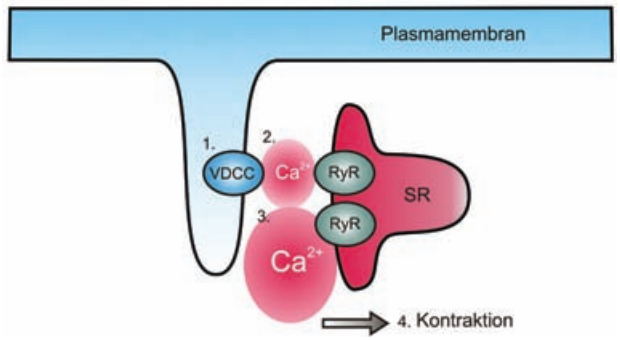


Abbildung 1: Elektromechanische Kopplung in Herzmuskelzellen. 1. Spannungsabhängige Calcium-Kanäle (VDCC) öffnen als Antwort auf einen elektrischen Reiz. **2.** Calcium (Ca^{2+}) strömt in die Zelle ein. **3.** Ryanodin-Rezeptoren (RyR) öffnen als Antwort auf den lokalen Calcium-Einstrom und setzen so Calcium aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) frei. **4.** Die Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration führt zur Kontraktion der Herzmuskelzelle.

Das ECC wird von der Zelle genau kontrolliert. Schon kleine Abweichungen in der Calcium-Konzentration können das System empfindlich stören, so dass die Zelle aus dem Takt gerät [2]. Wir konnten zeigen, dass ET-1 in kultivierten Herzmuskelzellen die Calcium-Konzentration im Zellkern erhöht [1]. Verantwortlich hierfür sind eine weitere Familie von Calcium-Kanälen, die Inositol-1,4,5-trisphosphat- Rezeptoren (IP_3R). Diese befinden sich in ventrikulären Kardiomyozyten in der Membran, die den Zellkern umgibt. Öffnen die IP_3R, erhöht sich die Calcium-Konzentration im Zellkern. Dort steuert Calcium die Genexpression, d.h., die nukleäre Calcium-Konzentration bestimmt, welche Proteine in der Zelle zur Verfügung stehen. Bei Stimulation der IP_3R mit ET-1 verändert sich die Proteinzusammensetzung in der Zelle so, dass die Zelle „glaubt“, sie wäre wieder in einem frühen Entwicklungsstadium, in dem sie an Größe zunehmen muss. Eine bereits vollständig entwickelte Zelle wird auf diese Weise „umprogrammiert“ und beginnt zu wachsen. Dies ist

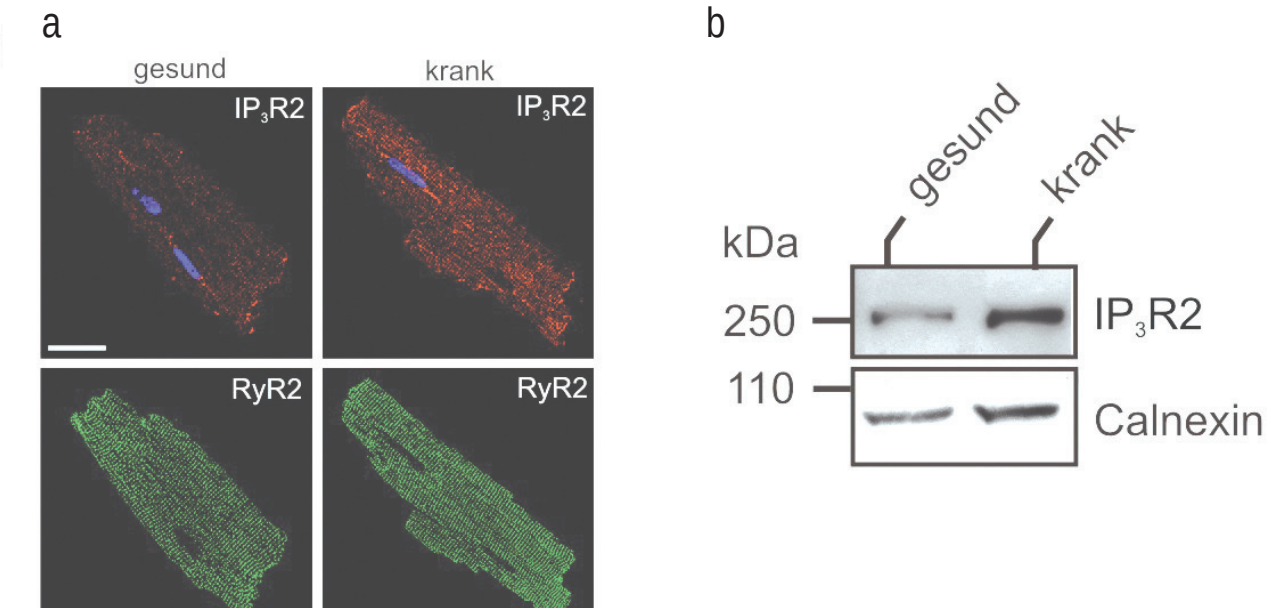


Abbildung 2: Expression und Verteilung von IP_3R2 in Herzmuskelzellen von gesunden Ratten und von Ratten mit chronischem Bluthochdruck. a. Immunzytochemische Analyse der Expression von IP_3R2 (rot) und RyR2 (grün). Die Zellkerne sind in blau gefärbt. Der Balken dient als Größenstandard (30 µm). **b.** Analyse der Expression von IP_3R2 in Herzmuskelzellen mittels Western Blot. Als Ladekontrolle wurde Calnexin nachgewiesen. Der Protein-Größenstandard in kDa ist angegeben.

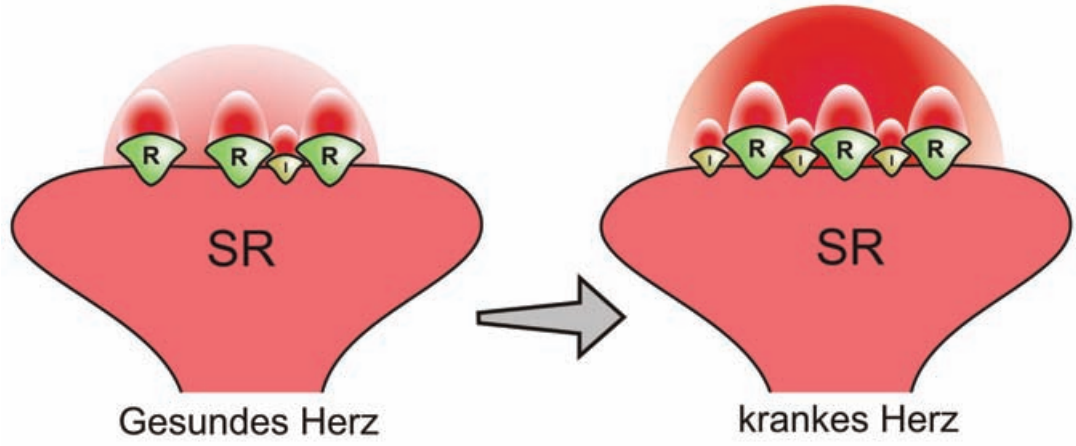


Abbildung 3: Veränderung in der Verteilung und Expression von IP_3R2 im kranken Herz. RyR (R) sind in grün, IP_3R2 (I) in gelb dargestellt. Das freigesetzte Calcium ist durch eine rote Wolke schematisch verdeutlicht.

der erste Schritt bei der pathologischen Vergrößerung des Herzens. Doch wie kommt es, dass sich die Situation so weit verschlechtert, dass das Herz aus dem Takt gerät und letztendlich sogar völlig versagt?

Diese Frage lässt sich an Herzmuskelzellen von Ratten mit chronischem Bluthochdruck untersuchen. Die Herzen wurden zu einem Zeitpunkt entnommen, an dem sie bereits vergrößert, jedoch noch keine Anzeichen eines Herzversagens beobachtet werden. Wir konnten zeigen, dass die Menge an IP_3R Typ 2 (IP_3R2) in den Herzmuskelzellen dieser Ratten erhöht ist (Abbildung 2) [3].

Überraschenderweise befinden sich diese Kanäle jetzt nicht mehr nur in der Kernmembran, sondern vermehrt in der Membran des SR in direkter Nähe zu den RyR. Aktiviert man die IP_3R2 durch ET-1, wird

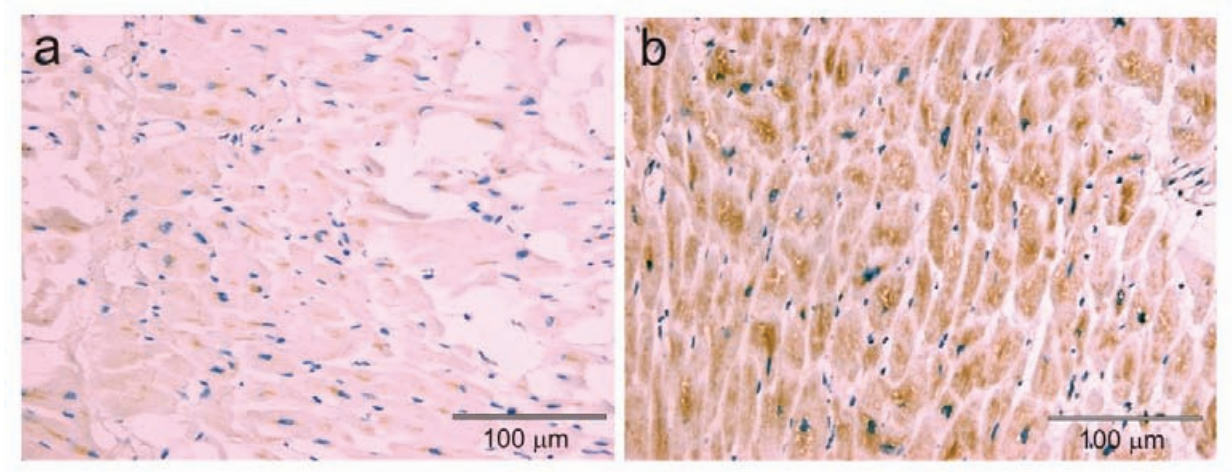


Abbildung 4: Expression von IP_3R2 im menschlichen Herzen. a. Gesundes Herz. **b.** Krankes Herz. Die Färbung für IP_3R2 ist in braun zu sehen, die Zellkerne sind in blau gefärbt. Der Balken dient als Größenstandard (100 µm).

Calcium nicht nur aus dem Kern, sondern vor allem aus dem SR freigesetzt. Die Menge ist, im Vergleich zu der, die durch RyR freigesetzt wird, gering. Jedoch befindet sich das Calcium-Signal in direkter Nähe zu den RyR (Abbildung 3). Diese werden dadurch aktiviert, setzen Calcium aus dem SR frei und die Zelle kontrahiert - jedoch in Abwesenheit eines elektrischen Stimulus, wodurch die Zelle und damit das gesamte Herz aus dem Takt geraten.

Interessanterweise beobachtet man diese Veränderungen nicht nur in den kranken Ratten, sondern auch in Patienten mit Herzversagen. Die Menge an IP_3R2 ist auch in Herzmuskelzellen der Patienten erhöht (Abbildung 4) [4], was dafür spricht, dass eine Veränderung in der Menge an IP_3R2 ein genereller Mechanismus ist, mit dem das Herz auf ein krankhaftes Größenwachstum reagiert.

Ausblick

Wir konnten zeigen, dass IP_3R sowohl an dem pathologischen Größenwachstum des Herzens beteiligt sind, als auch dazu beitragen, dass ein pathologisch vergrößertes Herz aus dem Takt gerät. Wir versuchen nun, die beteiligten Signalwege im Detail aufzuklären. Dabei konzentrieren wir uns auf Faktoren, die die Expression der IP_3R regulieren bzw. deren Lokalisation in der Zelle bestimmen. Interessanterweise spielen IP_3R2 im gesunden Herzen nur eine untergeordnete Rolle. Dies macht den IP_3R2 zu einem wichtigen Zielmolekül für die Pharmaindustrie und eröffnet neue Möglichkeiten bei der Suche nach Wirkstoffen zur Behandlung von Herz-Kreislauferkrankungen.

Referenzen

[1] Higazi, D. R., Fearnley, C. J., Drawnel, F. M., Talasila, A., Corps, E. M., Ritter, O., McDonald, F., Mikoshiba, K., Bootman, M. D., and Roderick, H.L. (2009) “Endothelin-1-Stimulated $InsP_3$-Induced Ca^{2+} Release Is a Nexus for Hypertrophic Signaling in Cardiac Myocytes” *Mol. Cell* 33, 1097-2765

[2] Roderick, H.L., Higazi, D.R., Smyrnias, I., Fearnley, C., Harzheim, D., and Bootman, M.D. (2007) “Calcium in the heart: when it’s good, it’s very very good, but when it’s bad, it’s horrid” *Biochem. Soc.Trans.* 35, 957-961

[3] Harzheim, D., Movassagh, M., Foo, R.S., Ritter, O., Tashfeen, A., Conway, S.J., Bootman, M.D., and Roderick, H.L. (2009) “Increased $InsP_3Rs$ in the junctional sarcoplasmic reticulum augment Ca^{2+} transients and arrhythmias associated with cardiac hypertrophy” *PNAS* 106, 11406-11

[4] Harzheim, D., Talasila, A., Movassagh, M., Foo, R.S., Figg, N., Bootman, M.D., and Roderick, H.L. (2010) “Elevated $InsP_3R$ expression underlies enhanced calcium fluxes and spontaneous extra-systolic calcium release events in hypertrophic cardiac myocytes” *Channels* (Austin.) 4, 67-71

Kontaktanzeige eines Spermiums: Sensibelchen sucht Eizelle zum Verschmelzen

Timo Strünker und U. Benjamin Kaupp
Molekulare Neurosensorik

Für die Befruchtung werden Spermien von der Eizelle aktiv angelockt. Die Eizelle sendet dazu Lockstoffe aus, die den Spermien den Weg weisen. Diesen Vorgang bezeichnet man als Chemotaxis. Spermien des Seeigels *Arbacia punctulata* reagieren extrem empfindlich auf ihren Lockstoff. Bereits ein einzelnes Lockstoffmolekül löst eine Reaktion der Spermien aus. Wie sich jetzt herausstellte, ist ein außergewöhnlicher zyklisch Nukleotid-gesteuerter Ionenkanal (CNGK) im Spermienschwanz der Schlüssel zur Einzelmolekülempfindlichkeit der Spermien. Der Lockstoff führt zur Synthese des Botenstoffs cGMP. Der strukturell einzigartige CNGK-Kanal wird bereits durch einen geringfügigen Anstieg der intrazellulären cGMP-Konzentration aktiviert und löst die chemotaktische Signalkaskade im Seeigelspermium aus.

Der Lockruf der Eizelle: Was Man(n) von Seeigeln lernen kann.

Ein neues Lebewesen entsteht, wenn weibliche und männliche Keimzellen miteinander verschmelzen. Haben Sie schon einmal darüber nachgedacht, wie bei der Fortpflanzung die männlichen Spermien zu den weiblichen Eizellen schwimmen? Anders formuliert: Wissen Sie, wie das Spermium das Ei findet? Eizelle und Spermium treffen sich nicht zufällig. Vielmehr werden Spermien von der Eizelle mit Hilfe von chemischen Stoffen angelockt. Die Lockstoffe weisen den Spermien den Weg zum Ziel (Abbildung 1). Diesen Vorgang bezeichnet man als *Chemotaxis*.

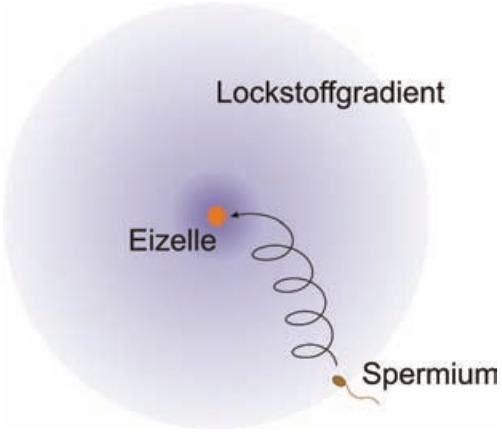


Abbildung 1: Lockstoffe weisen dem Spermium den Weg zur Eizelle. Der Lockstoffgradient, der die Eizelle umgibt, wird von einem Spermium wahrgenommen. Das Spermium orientiert sich an dem Gradienten und gelangt so zur Lockstoffquelle, der Eizelle.

Was sich einfach anhört, ist in Wirklichkeit ein komplexer Vorgang. Bei Säugetieren, der Mensch eingeschlossen, ist die Spermien-*Chemotaxis* noch wenig erforscht. Dies hat mehrere Gründe: Säugetiere sind interne Fertilisierer, die Befruchtung der Eizelle erfolgt im Körper des Weibchens. Die Bedingungen, die Spermien dort vorfinden, lassen sich im Labor nur schwer nachstellen. Die Forscher sind auf freiwillige

Samenspenden angewiesen – das Probenmaterial ist also nur begrenzt verfügbar. Außerdem konnte der Lockstoff der menschlichen Eizelle bisher nicht zweifelsfrei identifiziert werden.

In der Naturwissenschaft bedient man sich oft sogenannter Modellorganismen, bei denen alles einfacher zu sein scheint. Man versucht zunächst diese einfachen Systeme zu verstehen, um sie

Abbildung 2: Ein Seeigel der Art *Arbacia punctulata* gibt seine cremefarbige Samenflüssigkeit ab. Die Tiere erreichen eine Körpergröße von etwa 5 cm.

dann auf die komplexere Situation beim Menschen zu übertragen. Als Modell zur Erforschung der Spermien-Chemotaxis dienen seit mehr als 100 Jahren die Spermien und Eizellen von Seeigeln der Art *Arbacia punctulata* (Abbildung 2).

Seeigel sind Meeresbewohner, die in einer „konzertierten Aktion" ihre Keimzellen ins Wasser abgeben. Zur externen Befruchtung müssen sich dort Eizelle und Spermium finden. *A. punctulata*-Seeigel, die in großer Anzahl an der Nordamerikanischen Küste leben, lassen sich leicht einsammeln und ein männlicher Spender bringt es locker auf ~ 100 Milliarden Spermien. Zum Vergleich: Ein Mann gibt „nur" etwa 100-200 Millionen Spermien ab. Der Lockstoff, der von den Eizellen freigesetzt wird, ist schon lange bekannt: *Resact*, ein kleines Peptid, das aus 14 Aminosäuren aufgebaut ist und sich synthetisch herstellen lässt.

Spermien reagieren extrem empfindlich auf weibliche Reize.

Resact ändert im Spermienschwanz, dem Flagellum, die intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration (Ca^{2+}-Signal). Die Ca^{2+}-Signale ändern den Flagellenschlag und damit die Schwimmrichtung; sie dienen der Navigation, hin zur Lockstoffquelle, der Eizelle (Böhmer 2005). Wie löst der Lockstoff Ca^{2+}-Signale aus? Wir konnten in den letzten Jahren diese Frage beantworten (Abbildung 3; Strünker 2006, Kaupp 2003).

Zunächst bindet der Lockstoff an spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche des Spermiums. Jedes Spermium besitzt etwa 1 Million dieser Rezeptoren. Rund die Hälfte der Flagellenoberfläche ist mit Rezeptoren bedeckt. Das Flagellum fungiert also nicht nur als „Propeller" zum Antrieb, sondern auch als Antenne, als Nase, die Lockstoffe detektieren kann.

Der Rezeptor ist eine Guanylatzyklase (GC). Die GC ist Lockstoffrezeptor und Enzym zugleich. Bindet Resact außen an die GC, wandelt der enzymatische Teil im Inneren der Zelle Guanosintriphosphat (GTP) in einen Botenstoff – das zyklische Guanosinmonophosphat (cGMP) – um. cGMP öffnet Kalium-selektive Ionenkanäle (CNGK-Kanäle). Ionenkanäle sind winzige Schleusen in der Membran, durch die geladene Ionen über die – ansonsten undurchdringliche – Membran fließen. Durch die offenen CNGK-Kanäle verlassen K^+-Ionen die Zelle. Dadurch wird die Zelle negativ aufgeladen, sie hyperpolarisiert. Die Hyperpolarisation führt zur

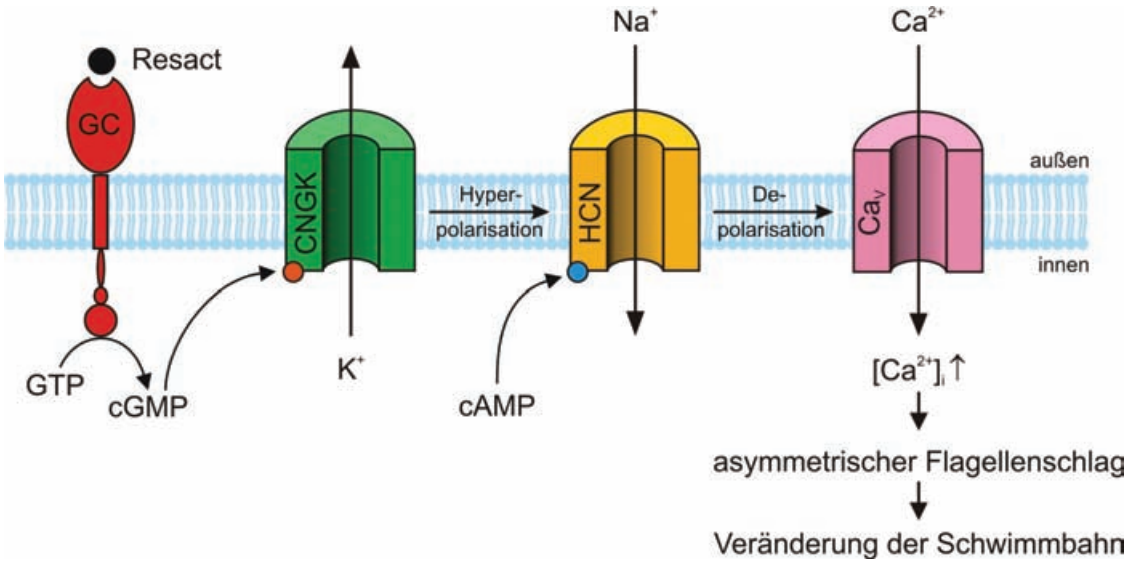


Abbildung 3: Chemotaktischer Signalweg im Seeigelspermium. Der Lockstoff *Resact* aktiviert eine Guanylatzyklase (GC). Die GC wandelt Guanosintriphosphat (GTP) in den Botenstoff zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) um. cGMP öffnet Kalium-selektive zyklisch Nukleotid-gesteuerte Ionenkanäle (CNGK); Kalium-Ionen (K^+) strömen aus der Zelle - die Zelle hyperpolarisiert. Die Hyperpolarisation aktiviert Calcium-Kanäle (Ca_V) und Calcium-Ionen (Ca^{2+}) strömen in die Zelle. Durch den Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration ($[Ca^{2+}]i$) ändert sich das Schlagmuster des Flagellums und die Schwimmbahn des Spermiums. Durch die Hyperpolarisation werden auch hyperpolarisationsaktivierte und zyklisch Nukleotid-gesteuerte Kanäle (HCN) aktiviert. Durch die HCN-Kanäle gelangen Natrium-Ionen (Na^+) in das Zellinnere – das Membranpotential kehrt zum Ruhewert zurück (Depolarisation). Neben cGMP steigt etwas später auch die Konzentration von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) an. Die Rolle und Quelle des cAMP ist unklar.

Aktivierung von zwei weiteren Ionenkanälen: Ca^{2+}-Kanäle, die unter Ruhebedingungen geschlossen sind, können jetzt öffnen und Ca^{2+} strömt in die Zelle ein. Zum Anderen werden hyperpolarisationsaktivierte und zyklisch Nukleotid-gesteuerte Ionenkanäle (HCN-Kanäle) geöffnet: Durch die HCN-Kanäle strömen Na^+-Ionen in die Zelle, und das Membranpotenzial kehrt zum Ruhewert zurück.

Spermien reagieren extrem empfindlich auf den Lockstoff: Sie können einzelne Lockstoffmoleküle detektieren. Spermien haben also die physikalisch vorgegebene Grenze der Empfindlichkeit erreicht. Die Aktivierung eines einzigen Rezeptors löst eine Hyperpolarisation von ~ 2 mV und ein Ca^{2+}-Signal aus. Eine Einzelmolekül-Empfindlichkeit konnte bisher an keiner anderen Zelle beobachtet werden. Lediglich Photorezeptoren im Auge können einzelne Lichtquanten detektieren. Für Photorezeptoren und Spermien gilt also: Sensibler geht´s nicht!

Ein außergewöhnlicher Ionenkanal macht Spermien zu Sensibelchen.

Der CNGK-Kanal ist der Schlüssel zum Verständnis für diese extreme Empfindlichkeit von Spermien (Bönigk 2009). Der CNGK-Kanal gehört zu einer hochspezialisierten Kanalfamilie, den sogenannten zyklisch Nukleotid-gesteuerten Kanälen (CNG-Kanäle). Sie werden durch die intrazellulären Botenstoffe cAMP oder cGMP aktiviert. „Klassische“ CNG-Kanäle, wie man sie in Sehzellen des Auges oder in Riechzellen der Nase findet, sind – wie andere Ionenkanäle auch - aus mehreren „Bausteinen“ oder Untereinheiten aufgebaut. CNG-Kanäle bestehen –

wie spannungsaktivierte Kalium-Kanäle (K_v) – aus vier identischen oder ähnlichen Untereinheiten, die sich zu einer Pore zusammenlagern. Sie bilden ein sogenanntes Tetramer. Spannungsabhängige Natrium- und Calcium-Kanäle (Na_v und Ca_v) dagegen bestehen aus einem einzigen großen Protein, das vier ähnliche Domänen enthält. Jede dieser Domänen „repräsentiert" eine Kanal-Untereinheit; man spricht von einer pseudotetrameren Anordnung. Der CNGK-Kanal hat von jedem etwas: er ist aufgebaut wie ein typischer Calcium- oder Natrium-Kanal, lässt aber nur Kalium-Ionen passieren. Wie ein klassischer CNG-Kanal besitzt er vier Bindestellen für zyklische Nukleotide. Er ist also eine Chimäre aus einem K_v-Kanal, CNG-Kanal und einem Ca_V/Na_V-Kanal (Abbildung 4): Diese Kanalstruktur macht CNGK zu einem einzigartigen Ionenkanal.

Wir isolierten die cDNA, die die Erbinformation für den CNGK-Kanal trägt, aus Hodengewebe von *A. punctulata*. Eine embryonale Nierenzelllinie wurde gentechnisch so verändert, dass sie als Ammenzelle den CNGK-Kanal produziert. In diesen Zellen konnten die Ionenströme durch den CNGK-Kanal genau gemessen werden. Überraschenderweise öffnet der Kanal bereits bei nanomolaren cGMP-Konzentrationen – er ist damit fast 1000-mal empfindlicher als klassische CNG-Kanäle aus Seh- oder Riechzellen. Die genaue Untersuchung des CNGK-Kanals förderte weitere überraschende Eigenschaften zu Tage: während andere CNG-Kanäle nur öffnen, wenn mindestens zwei der vier Bindestellen mit Botenstoff besetzt sind, genügt beim CNGK-Kanal ein einzelnes cGMP-Molekül, um den Kanal zu öffnen. Es ist die große Empfindlichkeit des Kanals für den Botenstoff cGMP, die es den Spermien ermöglicht einzelne Lockstoffmoleküle zu detektieren.

Nach der Bindung eines einzelnen Lockstoffmoleküls werden nur ca. 45 cGMP-Moleküle im Flagellum synthetisiert – die cGMP-Konzentration steigt also nur geringfügig an. Wenn so wenige cGMP-Moleküle synthetisiert werden, ist es unwahrscheinlich, dass gleichzeitig zwei, drei oder gar vier cGMP-Moleküle an ein und denselben CNGK-Kanal binden. Neben seiner enormen Empfindlichkeit, ist also für die Einzelmolekülantwort entscheidend, dass der CNGK-Kanal durch die Bindung eines einzelnen cGMP-Moleküls aktiviert wird.

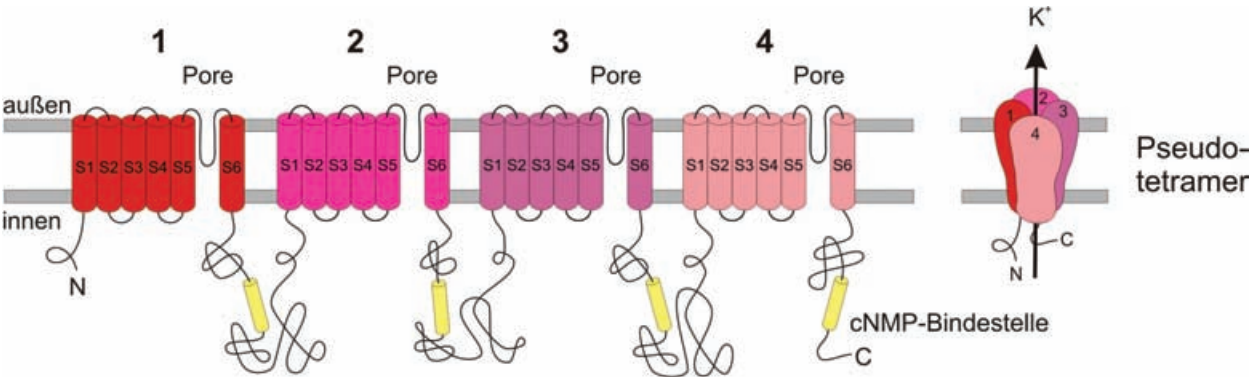


Abbildung 4: Aufbau des CNGK-Kanals aus Seeigelspermien. Der CNGK-Kanal besteht aus einem einzigen großen Protein, das vier ähnliche Domänen (1-4) enthält. Jede dieser Domänen „repräsentiert" eine Kanal-Untereinheit und besitzt eine Bindestelle (cNMP) für zyklische Nukleotide (cGMP; cAMP). Der Kanal besitzt eine pseudotetramere Struktur und ist selektiv für Kalium-Ionen (K^+).

Soweit zu den Seeigelspermien. Leider scheint bei menschlichen Spermien alles anders zu sein. CNGK-Kanäle sucht man hier vergebens; auch die meisten anderen Komponenten der chemotaktischen Signalkette findet man nicht. In menschlichen Spermien müssen also andere Signalwege existieren, die das chemotaktische Verhalten steuern. Eine Gemeinsamkeit gibt es allerdings: das Schwimmerhalten menschlicher Spermien wird ebenfalls durch die intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration gesteuert. Wir arbeiten zurzeit mit Hochdruck an der Aufklärung der chemotaktischen Signalwege in menschlichen Spermien.

Die Entschlüsselung der Einzelmolekül-Empfindlichkeit stellt einen wichtigen Fortschritt im Verständnis chemosensorischer Prozesse dar. Wahrscheinlich können – neben Sehzellen und Seeigelspermien – auch andere Zellen auf kleinste Reize extrem empfindlich reagieren, z.B. Nervenzellen, die durch Pheromone, Hormone oder Neurotransmitter aktiviert werden. Die Arbeit an den Seeigelspermien wird die Forschung auf dem Gebiet der Chemosensorik stimulieren und zur Aufklärung der Signalverarbeitung in anderen Zellen beitragen.

Referenzen

[1] Bönigk, W. , Loogen, A., Seifert, R., Kashikar, N., Klemm, C., Krause, E., Hagen, V., Kremmer, E., Strünker, T., and Kaupp, U.B. (2009) “An atypical CNG channel activated by a single cGMP molecule controls sperm chemotaxis” *Sci. Signal.* 2, ra68

[2] Strünker, T., Weyand, I., Bönigk, W., Van, Q., Loogen, A., Brown, J.E., Kashikar, N., Hagen, V., Krause, E., and Kaupp, U.B. (2006) “A K^+-selective cGMP-gated ion channel controls chemosensation of sperm” *Nature Cell Biology* 8, 1149-1154

[3] Böhmer, M., Van, Q., Weyand, I., Hagen, V., Beyermann, M., Matsumoto, M., Hoshi, M., Hildebrand, E., and Kaupp, U.B. (2005) “Ca^{2+} spikes in the flagellum control chemotactic behavior of sperm” *EMBO J.* 24, 2741-2752

[4] Kaupp, U.B., Solzin, J., Hildebrand, E.J., Brown, E., Helbig, A., Hagen, V., Beyermann, M., Pampaloni, F., and Weyand, I. (2003) “The signal flow and motor response controling chemotaxis of sea urchin sperm” *Nature Cell Biology* 5, 109-117

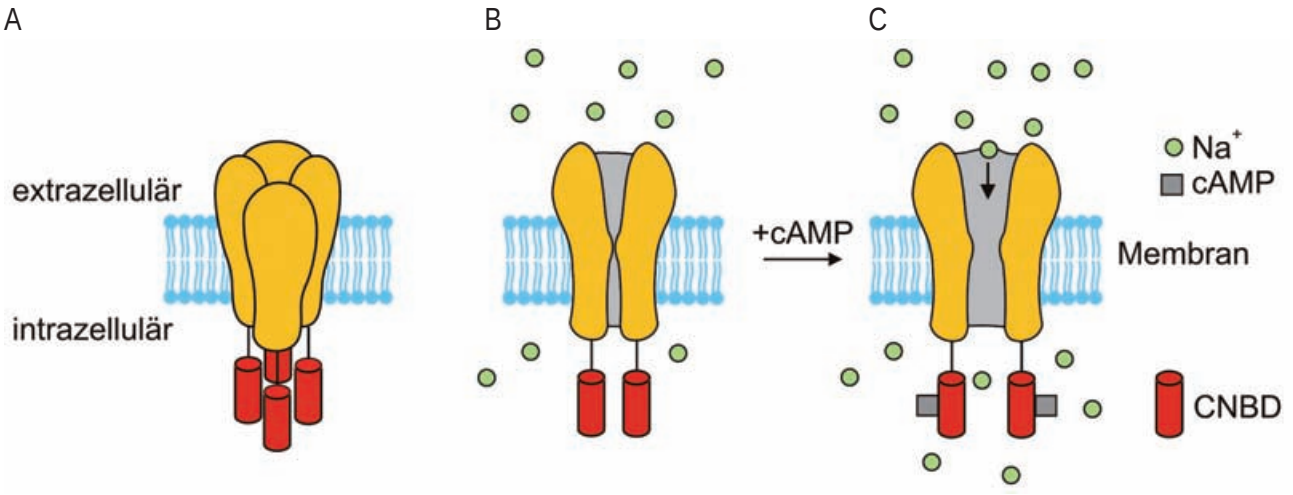
Ultraschnelles Einfrieren eines Aktivierungsprozesses - Eine Diashow molekularer Bewegung

Sebastian Peuker
Molekulare Neurosensorik

Jeder Organismus besitzt auf zellulärer Ebene eine Vielzahl von Rezeptoren, die die Zelle mit wichtigen Informationen versorgen. Rezeptoren nehmen Reize aus der Umgebung auf und leiten diese über komplexe Signalwege ins Innere der Zelle. Dort übernehmen oft sogenannte sekundäre Botenstoffe die Aufgabe, die überbrachte Information in eine zelluläre Antwort zu übersetzen. Einer der wichtigsten sekundären Botenstoffe ist das 3'-5'-zyklische Adenosinmonophosphat (cAMP). Mehr als zwei Drittel unserer Rezeptoren verändern nach ihrer Aktivierung die intrazelluläre Konzentration dieses Botenstoffes. Im Inneren der Zelle gibt es wiederum spezifische Zielproteine, die Bindestellen für cAMP besitzen. Wenn cAMP an diese Bindestellen andockt, verändern die Zielproteine ihre räumliche Struktur und gehen so vom inaktiven in einen aktiven Zustand über. Wir möchten den zeitlichen Verlauf der strukturellen Änderungen, die diese Proteine bei der Bindung von cAMP durchmachen, mit höchster Auflösung verfolgen, um mehr über die Arbeitsweise dieser Proteine zu erfahren.

Zyklische Nukleotid-gesteuerte Signalwege findet man in nahezu allen Organismen – vom Bakterium bis hin zum Menschen. Viele physiologische Prozesse werden über diese Botenstoffe reguliert. Demgegenüber stehen verhältnismäßig wenige Zielproteine, die zyklische Nukleotide binden und dieses Signal in eine zelluläre Antwort umwandeln. Zu diesen Zielproteinen gehören (1) bakterielle Transkriptionsfaktoren, die cAMP-abhängig die Transkription von Genen steuern, (2) die Proteinkinasen A und G, die bei Aktivierung durch cAMP bzw. cGMP Phosphatgruppen auf andere Proteine übertragen, (3) Austauschfaktoren, die bei kleinen GTP-bindenden Proteinen den Austausch von GDP zu GTP katalysieren, sowie (4) zyklisch Nukleotid-gesteuerte Ionenkanäle, die bei der Bindung der Botenstoffe öffnen und dadurch Zellen elektrisch erregen. So verschieden diese Proteine auch sind, ihre Bindestelle für zyklische Nukleotide (*cyclic nucleotide-binding domain*; CNBD) ist sehr ähnlich. Strukturuntersuchungen haben für all diese Bindestellen einen fast identischen dreidimensionalen Aufbau aufgedeckt. Es scheint demnach einen CNBD-Prototyp zu geben, der als Modul in ganz verschiedenen Proteinen als Steuerelement eingesetzt wird (Abbildung 1).

Wie genau funktioniert dieses Modul? Wie unterscheidet es cAMP von cGMP? Wie lange bleibt ein Ligand an der Bindestelle gebunden? Und wie ist die Abfolge der Ereignisse, die vom ersten Andocken des Liganden zum aktivierten Zustand des Proteins führt? Mit diesen Fragen beschäftigen wir uns in der Abteilung Molekulare Neurosensorik. Als Modellsystem haben wir einen bakteriellen zyklisch Nukleotid-gesteuerten Ionenkanal (CNG-



D

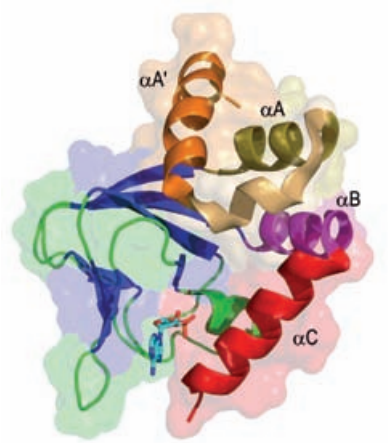


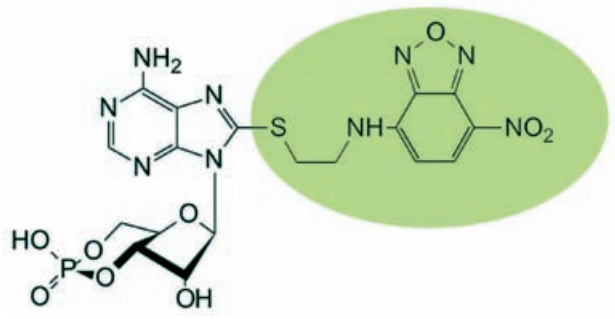
Abbildung 1: Schematische Darstellung eines zyklisch Nukleotid-gesteuerten Ionenkanals. A. Anordnung der vier Untereinheiten (orange) der zyklisch Nukleotid-gesteuerten Kanäle. Die Bindestellen für zyklische Nukleotide sind in rot dargestellt. **B.** Geschlossener und **C.** offener Zustand der Kanäle. Hier sind je nur zwei der vier Untereinheiten dargestellt. Ohne cAMP ist der Kanal geschlossen. Nach Bindung von cAMP öffnet der Kanal. **D.** Dreidimensionale Struktur der Bindestelle für zyklische Nukleotide (*cyclic nucleotide-binding-domain*, CNBD) des CNG-Kanals aus *Mesorhizobium loti* mit cAMP (Clayton *et al.* 2004).

Kanal) gewählt. Er ist aus vier Untereinheiten aufgebaut, die sich um eine zentrale Pore anlagern. Jede Untereinheit besteht aus einer Membrandomäne und der intrazellulär gelegenen CNBD, d.h. jeder Kanalkomplex benutzt vier CNBDs (Abbildung 1A).

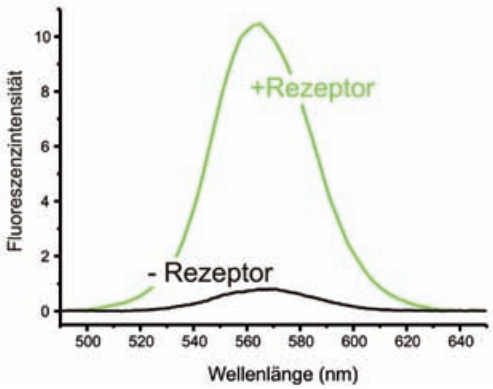
Wir beschäftigten uns zunächst mit der isolierten CNBD. Am Anfang wurde die Kinetik der Bindung des Liganden an die isolierte CNBD untersucht. Die Kinetik ist deswegen so interessant, weil durch sie die Aufenthaltszeit des Liganden am Rezeptor beschrieben wird und somit, in erster Näherung, die Zeit, in der der Rezeptor aktiviert ist. Die Kinetik und damit die Zeit der Rezeptoraktivierung ist bisher für keine CNBD beschrieben worden.

Aber langsam – was sind überhaupt Bindung und Kinetik? In der Biophysik versteht man unter Bindung die molekulare Wechselwirkung des Liganden mit dem Rezeptor. Ein quantitatives Maß für die Bindungsstärke ist die Dissoziationskonstante K_D. Sie gibt die Konzentration des Liganden an, bei der die Hälfte der Rezeptoren mit Liganden besetzt sind. Das heißt, je kleiner der K_D-Wert ist, umso höher ist die Affinität. Informationen über den zeitlichen Verlauf der Bindungsreaktion - die Reaktionskinetik - enthält der K_D-Wert aber nicht. Um die Kinetik der Reaktion genau zu charakterisieren, müssen zwei Konstanten bestimmt werden. Eine spiegelt die Geschwindigkeit der Bildung und die andere die Geschwindigkeit des Zerfalls des Protein-Ligandenkomplexes wider.

A



B



C

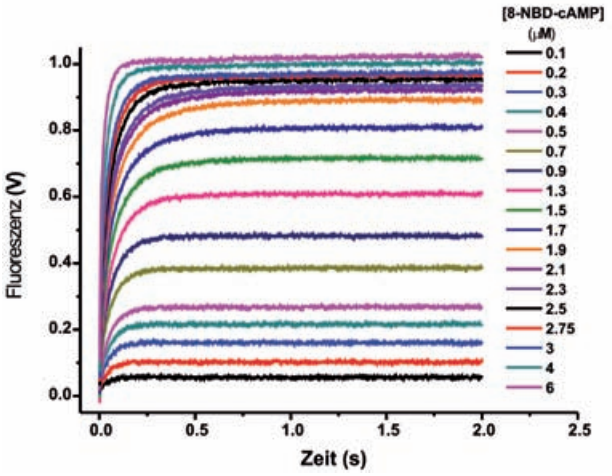


Abbildung 2: 8-substitierte Nukleotide als Werkzeug für Bindungsmessungen. A. Umgebungssensitiver Farbstoff 8-NBD-cAMP. Der Umgebungssensor ist grün hinterlegt. **B.** Fluoreszenzemissionsspektrum von 8-NBD-cAMP mit und ohne CNBD. In Gegenwart von der CNBD steigt die Fluoreszenzemission um das 15-fache an. **C.** Zeitaufgelöste Bindungsmessung. Die stets gleiche Menge CNBD wurde mit immer größeren Mengen 8-NBD-cAMP gemischt und die Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Zeit gemessen. Aus den so gemessenen Daten werden mit Hilfe eines mathematischen Modells die kinetischen Konstanten bestimmt.

Da die Bindungsreaktion nicht so einfach zeitaufgelöst beobachtet werden kann, mussten wir in die wissenschaftliche Trickkiste greifen. Wir haben ein zyklisches Nukleotid verwendet, das mit einem Umgebungssensor ausgestattet wurde, der anzeigt, ob es frei in Lösung oder an die CNBD gebunden vorliegt. Mit diesem Hilfsmittel konnten wir den Verlauf der Bindungsreaktion mit hoher Zeitauflösung verfolgen und sämtliche Raten und Zeitkonstanten bestimmen, die für unser Verständnis, wie diese CNBD funktioniert, notwendig sind (Abbildung 2).

Neben der CNBD haben wir auch Mutanten dieses Proteins untersucht. Außerdem haben wir die Reaktionskinetik der CNBD für unterschiedliche Liganden charakterisiert. Besonders interessant war für uns der Vergleich der CNBD mit der niedrig affinen Mutante R348A. An der Stelle 348 ist die Aminosäure Arginin durch die Aminosäure Alanin ausgetauscht. Das hat zur Folge, dass der K_D-Wert von 22,0 nM auf 7,3 µM steigt – die Affinität wird also um den Faktor 350 schlechter. Welchen Einfluss hat das auf die Kinetik? Die Antwort ist in diesem Fall erstaunlich einfach; die Geschwindigkeit der Komplexbildung bleibt konstant und nur die Geschwindigkeit des Zerfalls nimmt zu! Was sich also hauptsächlich ändert, ist die Zeit, mit der der Ligand an der Bindestelle verweilt. Im Falle der CNBD beträgt die Halbwertszeit des Komplexes 3 Sekunden, für die Mutante nur etwa 4 Millisekunden. Dass sich die Halbwertszeiten 750-fach, die Affinitäten aber nur 350-fach unterscheiden, lässt sich auf die

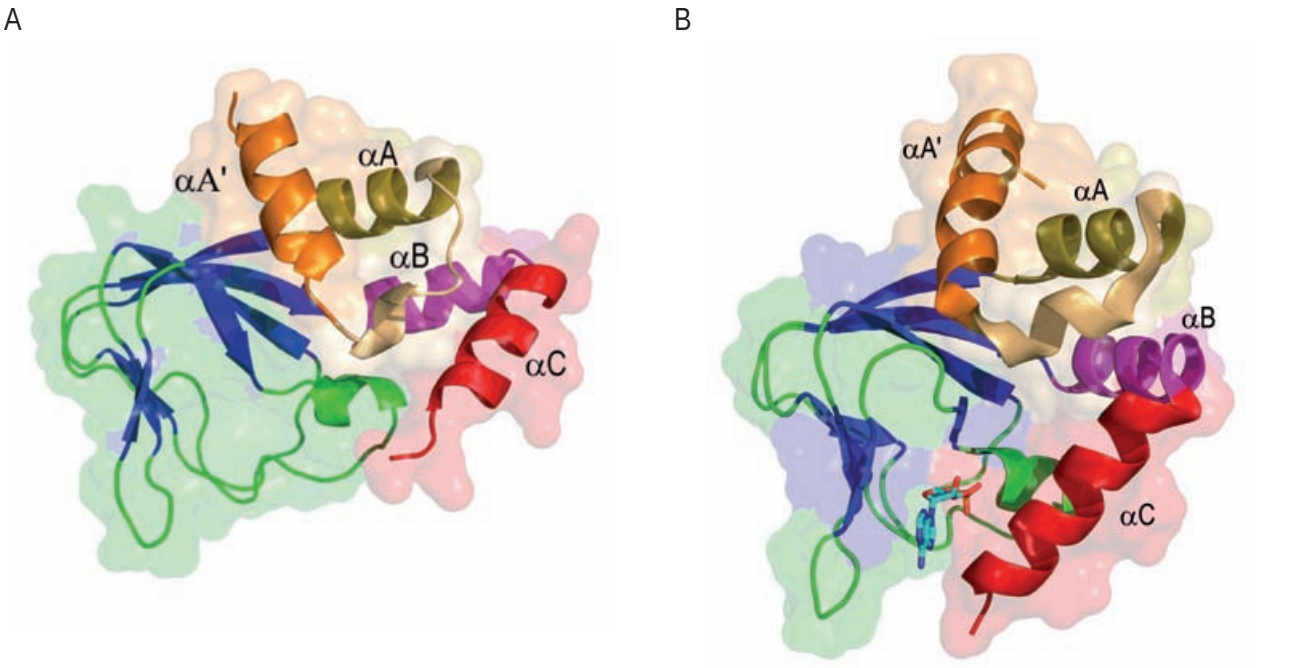


Abbildung 3: Dreidimensionale Struktur der Bindestelle für zyklische Nukleotide (*cyclic nucleotide-binding-domain*, CNBD) des CNG-Kanals aus *Mesorhizobium loti* (A) ohne und (B) mit cAMP. Man erkennt große strukturelle Veränderungen in den helikalen Bereichen α A' - α C (Clayton *et al.* 2004).

Ungenauigkeit des für die R348A-Mutante bestimmten K_D-Wertes zurückführen. Da sich die R348A-Mutation nur auf die Zerfallsgeschwindigkeit auswirkt, fragten wir uns, ob die Bindungseigenschaften der CNBD ausschließlich über die Zerfallsgeschwindigkeit kontrolliert werden.

Schnell war klar, dass dies nicht der Fall ist. Vergleicht man nämlich die Reaktionskinetiken verschiedener Liganden, beobachte man einen gemischten Effekt. Das zyklische Nukleotid mit Umgebungssensor (8-NBD-cAMP) hat einen K_D-Wert von 22,0 nM, der natürliche Ligand cAMP hat einen K_D-Wert von 67,6 nM. Die Auswertung der Kinetik zeigt, dass sich der Komplex der CNBD mit cAMP etwa 3-fach schneller bildet, jedoch auch 8-fach schneller zerfällt, als der Komplex mit 8-NBD-cAMP. Somit ergibt sich insgesamt für cAMP eine niedrigere Affinität als für 8-NBD-cAMP.

Uns interessiert besonders, wie die Bindung des Botenstoffs die Konformationsänderung in der CNBD auslöst. Wir kennen bereits den Anfangszustand, also das Protein in Abwesenheit des Liganden, sowie den Endzustand, also das Protein mit gebundenem Liganden. Für diese beiden Zustände gibt es hochaufgelöste dreidimensionale Strukturen. Vergleicht man diese beiden Zustände, so erkennt man einen verhältnismäßig unbeweglichen Bereich, der aus β-Faltblattstrukturen aufgebaut ist, sowie einen dynamischen Bereich, der vor allen Dingen die α-helikalen Anteile des Proteins umfasst (Abbildung 3). Wir wollen nun den Übergang vom Anfangszustand in den Endzustand zeitaufgelöst verfolgen. Welche Domänen reagieren als erste auf das Andocken des cAMP? Finden die Umlagerungen sequenziell, also nacheinander, oder aber konzertiert statt? Auch hier ist es schwierig, die räumlichen Änderungen zeitaufgelöst zu verfolgen. Wir können

aber spezielle Sonden, sogenannte Spinlabels, in unser Protein einbauen und den Abstand dieser Sonden bestimmen.

Es müssen immer zwei Sonden in das Protein eingefügt werden. Wenn das Protein an unterschiedlichen Positionen doppelt markiert wird, erhält man ein Netzwerk aus Abständen, aus denen man die jeweilige Konformation des Proteins bestimmen kann. Da die Messung zur Bestimmung des einzelnen Abstandes zwischen zwei Spinlabels mehrere Stunden dauert, planen wir, unser Protein in den verschiedenen Zwischenzuständen einzufrieren. Für dieses Projekt haben wir in enger Zusammenarbeit mit Simon de Vries von der Technischen Universität Delft eine MHQ-Anlage gebaut. MHQ steht für *microsecond-hyperfreeze-quenching*. Dabei handelt es sich um eine Anlage, die zwei Lösungen sehr schnell miteinander mischt und anschließend einfriert. Der spezielle Mixer, das Herzstück der MHQ-Anlage, kann die Lösungen in weniger als 1 Mikrosekunde zusammenbringen. Die so gemischte Lösung tritt unter hohem Druck als dünner Strahl aus der Mischkammer aus und wird auf einen -196°C kalten Metallzylinder gesprüht, wo sie in 30-40 Mikrosekunden einfriert. Durch Veränderung des Abstandes von Mixer und Metallzylinder kann über die Reaktionszeit der jeweilige Zwischenzustand, den man untersuchen will, eingestellt werden (Abbildung 4). Der früheste Zeitpunkt, den wir beobachten können, setzt sich aus der Mischzeit, der minimalen Flugzeit und der Einfrierzeit zusammen und beträgt bei unserem System ca. 85 Mikrosekunden. Kein anderes System in der Welt ist zurzeit schneller. Mit dieser fantastischen Anlage können wir nun die Abstände im untersuchten Protein zeitaufgelöst verfolgen und eine vierdimensionale Karte des Proteins entwerfen, wobei die vierte Dimension die Zeit nach der Aktivierung ist. Aber nicht nur für die CNBD-Fragestellung ist diese

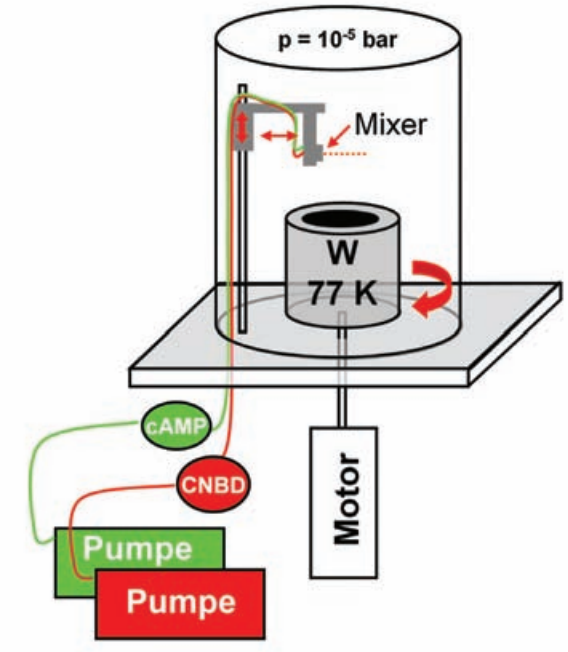


Abbildung 4: MHQ-Anlage. Zwei HPLC-Pumpen versorgen den Mixer mit der Protein- (CNBD) und Ligandenlösung (cAMP). Ein Jet der gemischten Lösung tritt mit bis zu 400 m/s aus der Mischkammer aus. Der Mixer wird in den rotierenden, -196°C kalten (77 Kelvin) Metallzylinder abgesenkt und die Probe auf die kalte Oberfläche aufgesprüht. Sie friert sofort ein.

Anlage geeignet. In gleicher Weise lassen sich auch andere Proteine, beispielsweise Rezeptoren und Enzyme, untersuchen. Die einzige Einschränkung ist, dass die Prozesse, die man untersuchen will, durch die Bindung eines Liganden initiiert werden müssen. Wir dürfen gespannt sein.

Referenzen

[1] Kaupp, U.B. and Seifert, R. (2002) "Cyclic nucleotide-gated ion channels" *Physiol. Rev.* 82, 769-824

[2] Clayton, G.M., Silverman, W.R., Heginbotham, L., and Morais-Cabral, J.H. (2004) "Structural basis of ligand activation in a cyclic nucleotide regulated potassium channel" *Cell* 119, 615–627

[3] Cukkemane, A., Grüter, B., Novak, K., Gensch, T., Bönigk, W., Gerharz, T., Kaupp, U.B., and Seifert, R. (2007) „Subunits act independently in a cyclic nucleotide-activated K^+ channel“ *EMBO J.* 8, 749-755

[4] Henzler-Wildman, K.A. and Kern, D. (2007) „Dynamic personalities of proteins” *Nature* 450, 964-972

[5] Cherepanov, A.V. and de Vries, S. (2004) „Microsecond freeze-hyperquenching (MHQ). Development of a new ultrafast micro-mixing and sampling technology and application to enzyme catalysis“ *Biochimica et Biophysica Acta* 1656, 1-31

Neurodegenerative Diseases and Proteopathies

Bruno Bulic
Chemical Biology of Neurodegenerative Diseases

The industrial revolution at the beginning of the 20th century has drastically modified our living environment. From the Bronze Age until the beginning of the last century, the human average life expectancy was merely 40 years. The malnutrition and a limited knowledge about hygene and contagious diseases limited severely the probability to live longer than 50 years. Noteworthy, women were particularly affected, with pregnancy being more hazardous than going to war. Yet, progress in the sciences during the last century allowed the sizeable increase in life expectancy that we are enjoying today. However, the other side of the medal, the emergence of diseases strongly tied to aging, becomes now visible. The well-known trilogy of cardiovascular disorders, diabetes and cancer is complemented by diseases affecting the central nervous system. The prevalence of Alzheimer´s disease is expected to follow the aging trend of the worldwide population, with an estimated growth from today's 26 million patients to 107 millions by 2050. Therefore, efforts have been made over the last decades to better understand the etiology of Alzheimer´s disease and to provide efficient therapeutics for the suffering patients.

What is Alzheimer´s Disease?

This neurodegenerative disease has been named after the neuropathologist Alois Alzheimer who first described the symptoms and physiopathology of the disease. The symptoms at an early stage include generally mood disorders, followed by language decline and ultimately loss of several body functions and death. The progression of the disease from the initial state, also called mild cognitive impairment (MCI), to the final state might take 10 to 15 years, with first symptoms typically appearing at 60-65 years of age. It is evident that the slow progression of the disease along with the dramatic symptoms severely affect the patient and its relatives. Figure 1 illustrates the cognitive deficits in the self-portrait of William Utermohlen at two different stages of his life. Although our understanding of the biological processes leading to neurodegeneration has tremendously progressed

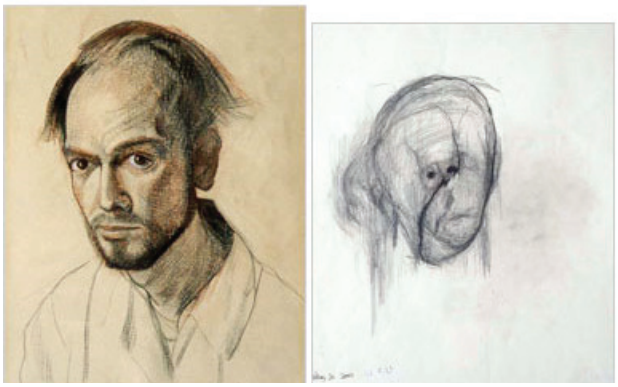


Figure 1: William Utermohlen self-portraits at ten years interval. The artist was diagnosed with Alzheimer´s disease at age 62.

over the last decades, the trigger mechanism is still speculative. Alzheimer´s disease is characterized by a massive neuronal loss leading to cavities in the brain cortex, as well as deposits of aggregated peptides called amyloid plaques. Moreover, intracellular aggregates of the microtubule-associated protein tau

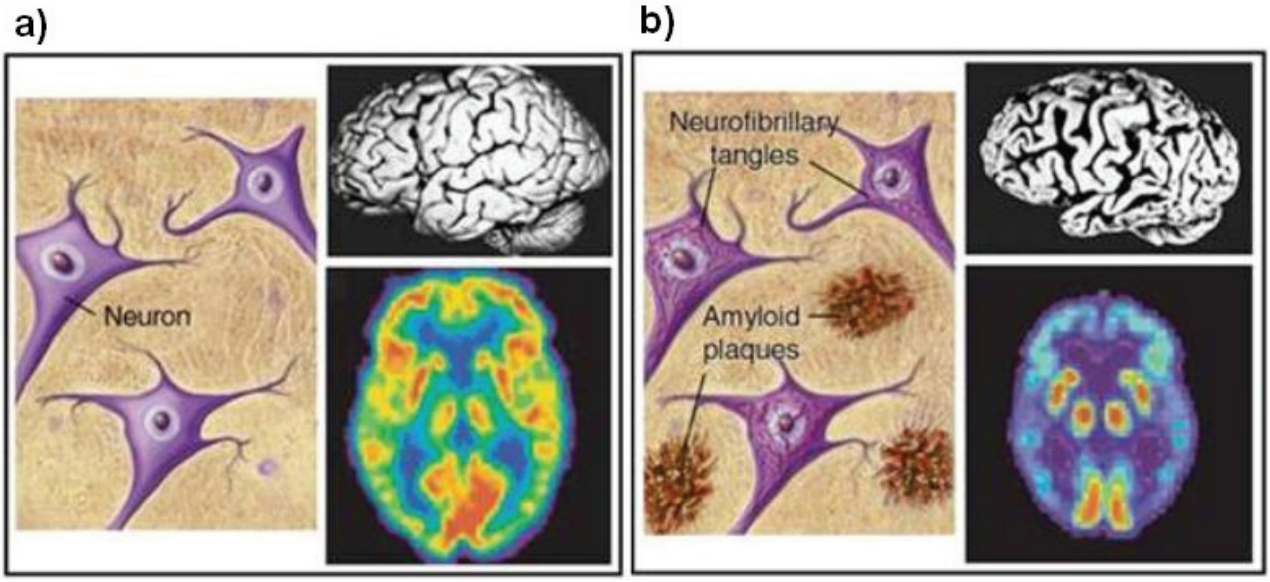


Figure 2: Physiopathology of Alzheimer´s disease. a. Schematic representation of a normal neuron and positron emission tomography of a healthy brain. b. Neurons and brain in Alzheimer´s disease, with the characteristic accumulation of extracellular amyloid aggregates and intraneuronal tangles (Adapted from: American Health Assistance Foundation).

form so-called tangles (Figure 2).

One explanation for the neurodegenerative mechanism is named the amyloid cascade hypothesis, due to the putative upstream toxicity of the amyloid fibrils that induce several neuronal deficits and ultimately cell death. Although other theories are debated, the amyloid hypothesis is supported by the observation that mutations in the amyloid precursor protein (APP) or in the protease processing this peptide in rare familial Alzheimer patients are fully penetrant. Therefore, strategies targeting the amyloid protein aggregation are expected to eventually result in an efficient drug.

Amyloids and Proteopathies

A variety of other pathologies are linked to the aggregation of proteins, such as Parkinson´s and Huntington´s disease or type II diabetes. Unfortunately, the self-assembly of the involved proteins leading to the cytotoxic aggregates is still poorly understood. It appears that the self-assembly of peptides to form aggregates initially involves an elusive perturbation of the native peptide conformation which correlates with the formation of ß sheets in the secondary structure. These ß sheets are prone to intra- and intermolecular self-assembly, forming the core of the fibrillar aggregates (Figure 3a). The fibrils typically take the shape of a helically twisted filaments (Figure 3b).
The aggregates might form inside or outside of cells, and disrupt the cellular organization and structure. In addition, the loss of function of the entrapped proteins might also account for the pronounced overall toxicity. Moreover, intermediates of the aggregation pathways, such as small oligomers resulting from the assembly of just a few peptides, might also be involved in cellular degeneration.

Therefore, we are interested both in a better understanding of the self-assembly mechanisms, and the inhibition or removal of these toxic aggregates and oligomers. The last point can be addressed by

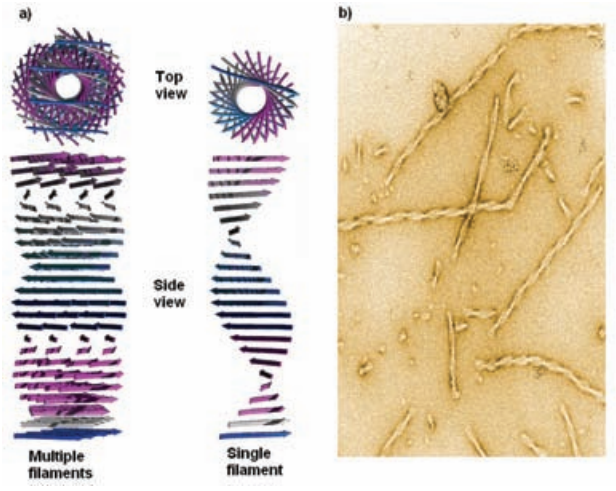
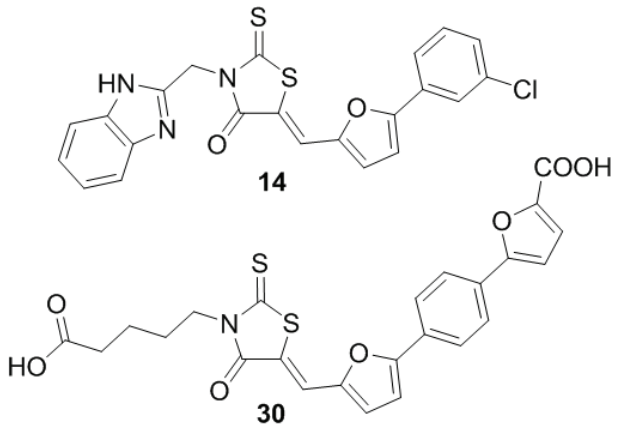


Figure 3: Amyloid fibrils. a. Schematic representation of the peptide assembly. **b.** Atomic force microscopy of aggregated peptides.

two different strategies: direct interference with the aggregation-prone peptides, and by inhibition of the mechanism that generates the toxic peptides.

Anti-Amyloid Strategies

Alzheimer´s disease is characterized by extracellular accumulation of Ab42 peptides and intracellular aggregation of the microtubule-associated tau protein. The ability to interfere with the aggregation-competent species, such as monomers, oligomers and fibrils, would permit to better understand the relevance of these molecular species for cytotoxicity, but also to develop drugs. In collaboration with the Mandelkow laboratory at the Max-Planck Institute in Hamburg, we have synthesized a variety of compounds which were tested for their ability to inhibit aggregation of several proteins such as tau [1]. A structure-based rational design of aggregation inhibitors is currently not achievable, because the target´s structure at the atomic level is not available. We therefore opted for the synthesis of a compound library based on selected heterocyclic compounds, as depicted in Scheme 1.



Scheme 1: Chemical structures of protein aggregation inhibitors. Compounds 14 and 30 are based on the rhodanine heterocycle.

As depicted in Figure 4 by atomic force microscopy, the fibril formation is abolished by the inhibitor. The inhibitors have been later improved for in vivo investigations, following medicinal chemistry principles for an adequate membrane permeability, safety, and stability. The in vivo investigations are still ongoing. We currently design and synthesize aggregation inhibitors with improved selectivity for the intermediates of b-amyloids such as small oligomers.

A complementary strategy to avoid the buildup of aggregates would be to avoid the protein's posttranslational modifications or simply their generation. Indeed, the extracellular deposition of the Ab42 peptide is preceded by the cleavage by proteases of a precursor protein called the Amyloid Precursor Protein or APP. Therefore, inhibition of the protease, the γ-secretase, is expected to significantly decrease the levels of aggregation-prone Ab42 peptides, and consequently to avoid the fibril formation in the brain. However, full inhibition of the γ-secretase protease proved to cause severe side effects. The γ-secretase is indeed a highly complex protease, formed by several subunits, with a complex

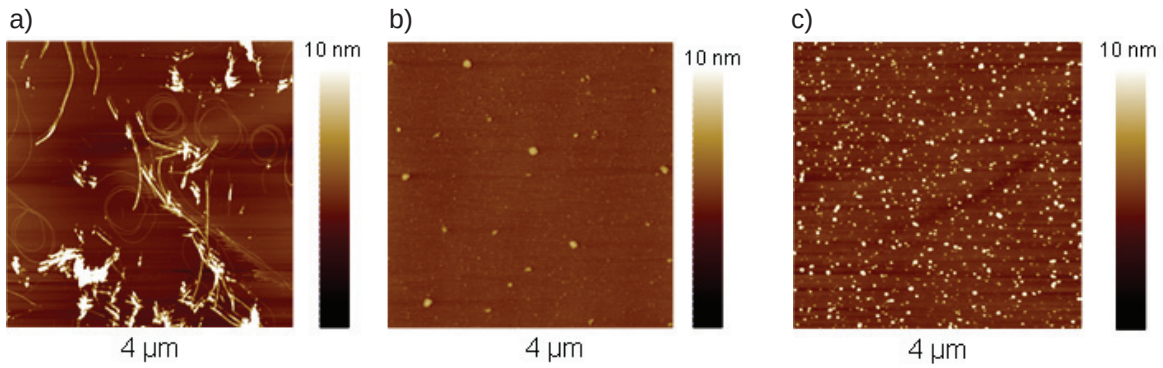
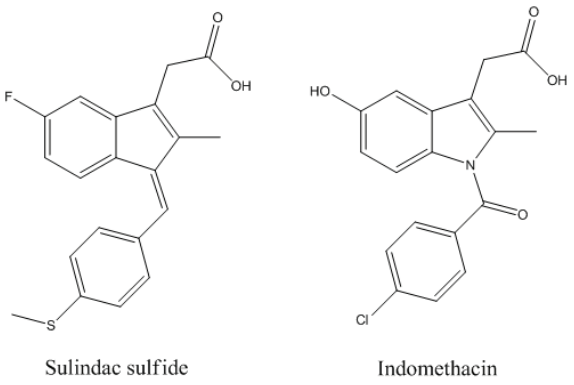


Figure 4: Visualisation of the aggregation inhibition. Atomic force microscopy images of the amyloid fibrils of **a.** pure IAPP and IAPP in the presence of a molar ratio 1:1 of **b.** compound 14 and **c.** compound 30. Note the disappearance of the fibrils in b. and c.

catalytic function and regulation. This γ-secretase represents an interesting model for the investigation of intramembrane proteolysis.

We have identified several compounds belonging to the class of Non-Steroidal Anti-inflammatory Drugs (NSAIDs) as modulators of the γ-secretase activity. Noteworthy, epidemiological studies have highlighted the beneficial impact on Alzheimer´s disease incidence in populations taking NSAIDs chronically. The generation of a library of indomethacin and sulindac derivatives (Scheme 2) has allowed to determine the structure-activity relationship of selected compounds, showing that electron-withdrawing substitutents are required, as well as lipophilic side chains.



Scheme 2: Chemical structures of γ-secretase modulators.

However, the pharmacokinetics of available NSAIDs, although well suited for peripheral analgesia, is not optimized for the central nervous system. In collaboration with the Weggen laboratory at the Heinrich-Heine University in Düsseldorf, we therefore, further develop improved compounds with an increased biocompatibility based on the indomethacin and ibuprofen scaffolds [2]. In addition to the design and synthesis of disease-modifying drugs, we also have a strong interest in the elucidation of the physiological regulation of the γ-secretase activity. We have designed photoactivatable substances, which covalently bind to their target on U.V. light irradiation. The photoactivatable γ-secretase modulators will be used to identify their binding site on the γ-secretase, in order to reveal the structural changes of the protease leading to changes in its proteolytic activity.

Photoactivatable Compounds

The investigation of biological systems benefits form techniques to rapidly elicit stimuli and monitor the response with high spatio-temporal resolution. To this end, bioactive molecules are inactivated by conjugation with a photoactivatable moiety, which

can be cleaved by irradiation to liberate the active substance. For instance, this has been successfully applied in the laboratory of U. Benjamin Kaupp at caesar for the study of sensory systems including sperm cells. The swimming behaviour of human sperm in response to progesterone is accompanied by a Ca^{2+} influx that can be controlled with high spatial and temporal precision with photoactivatable caged progesterone. Furthermore, the investigation of the brain's wiring using photoactivatable neurotransmitters might contribute to a better understanding of the organization and modulation of neuronal networks, which in turn might help to understand sensory input integration and memory maintenance. Here again, the control over the spatial and temporal release of the neurotransmitters is extremely important for the experiments. Indeed, in some area of the brain, the distances between neighboring dendritic spines are in the micrometer range, therefore a selective activation of a single spine requires an extremely localized release of the neurotransmitters (Figure 5).

γ-Aminobutyric acid (GABA) is the main inhibitory

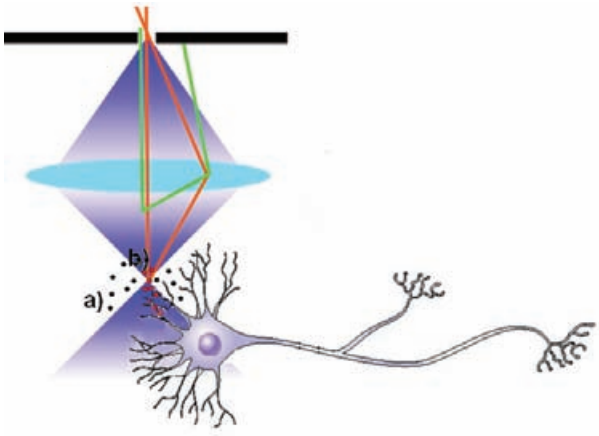
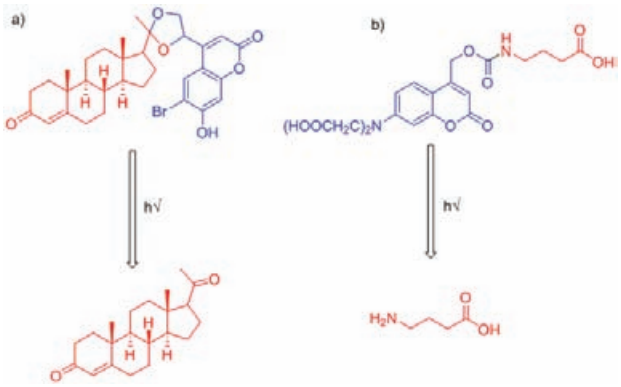


Figure 5: Focused neurotransmitter release. a. Inactive neurotransmitter (black dots). **b.** The neurotransmitter is activated at the focal point (red dots) with single-spine resolution.



Scheme 3: Structures of the photoactivatable progesterone and γ-aminobutyric acid. a. The protected progesterone (red) liberates the active progesterone upon photoactivation. **b.** Protected GABA (red).

neurotransmitter in the mammalian central nervous system. Using multi-photon uncaging technology with photoactivatable-GABA allows the laboratory of Heinz Beck at the Life & Brain Institute in Bonn to modulate the action potentials at the single spine level, and therefore advances our understanding of the role of the stimulated receptor for the integration of signalling inputs. We have synthesised the *N*-{7-[bis(carboxymethyl)amino]coumarin-4-yl}methoxycarbonyl-caged GABA (*N*-BCMACMOC-caged GABA) with good photoefficiency and high water solubility (Scheme 3). We aim at further optimizing the physicochemical properties of the photoactivatable progesterone and neurotransmitters.

Outlook

The research at the interface between chemistry and biology, also called chemical biology, offers the opportunity to answer challenging questions in biology with the help of innovative chemical tools. We will further intensify our efforts in the development and improvement of bioactive substances, and in compounds that have the unique ability to interfere with normal or pathological biological processes.

Literature

[1] Bulic, B. (2009) “Development of Tau Aggregation Inhibitors for Alzheimer´s Disease” *Angew. Chem. Int. Ed.* 48, 1740-1752

[2] Bulic, B. (2010) “Chemical Biology, Molecular Mechanisms and Clinical Perspectives of Gamma-Secretase Modulators in Alzheimer´s Disease” *Curr. Neuropharmacol.*, in press.

KonTEM - Ein neues Phasenkontrastsystem für Transmissionselektronenmikroskope

Stephan Irsen
Elektronenmikroskopie und Analytik

Bei bildgebenden Verfahren ist ein hoher Kontrast wichtig. In der Kryo-Transmissionselektronenmikroskopie ist der Bildkontrast schwach. Defokussieren verbessert den Kontrast, allerdings zu Lasten der Auflösung. Durch Einsatz eines Phasenkontrastsystems lassen sich kontrastreiche Bilder im Fokus erzeugen, ohne die Auflösung zu verringern.

Mit einem Transmissionselektronenmikroskop lassen sich Strukturen von einigen µm bis zu 50 pm analysieren [1]. In der Biologie ist dabei besonders die Untersuchung der dreidimensionalen Struktur von Zellorganellen und Makromolekülen interessant [2]. Um biologische Proben in einem möglichst lebensnahen Zustand untersuchen zu können, friert man sie ein – man vitrifiziert sie in amorphem Eis – und analysiert sie bei Temperaturen unter -140°C. Diese Technik wird als Kryo-Transmissionselektronenmikroskopie (Kryo-TEM) bezeichnet.

Gefrorene, biologische Proben sind sehr strahlempfindlich. Die Elektronendosis, die für ein Bild genutzt werden kann, ist so niedrig, dass oft die Nachweisgrenze des Detektors erreicht wird. Dies führt zu stark verrauschten Bildern; die Auflösung verschlechtert sich. Neben der Auflösung ist ein hoher Bildkontrast wichtig. Im Gegensatz zu materialwissenschaftlichen Proben zeigen biologische Proben nahe der Fokusebene fast keinen Bildkontrast. Um den Kontrast zu verbessern, kann man biologische Proben mit Schwermetallsalzen behandeln. Ist dies nicht möglich, z.B. bei gefrorenen Proben, kann der Kontrast auch durch starkes Defokussieren verbessert werden. Dabei verschlechtert sich allerdings die Auflösung. Eine neue Möglichkeit, fokussierte und gleichzeitig kontrastreiche Bilder zu erhalten, liefern spezielle optische Elemente, sogenannte Phasenkontrastsysteme (PCS). Bei Einsatz dieser Elemente verschlechtert sich die Auflösung nicht.

Was ist Phasenkontrast?

Elektronen in einem TEM lassen sich wie Licht als Welle beschreiben. Die Elektronen des Elektronenstrahls treten mit der Probe in Wechselwirkung; dies erzeugt den Bildkontrast. Verändern können sich Amplitude oder Phase der Wellenfunktion. Im ersten Fall spricht man von Amplitudenkontrast, im zweiten Fall von Phasenkontrast. Bei Proben, die schwere Elemente enthalten, überwiegt der Amplitudenkontrast. Schwere Elemente streuen die Elektronen so stark, dass sie nicht mehr zur Bildentstehung beitragen können; die entsprechenden Bereiche der Probe erscheinen dunkel. Bei sehr dünnen oder aus leichten Elementen zusammengesetzten Proben, z.B. bei gefrorenem biologischem Material, ändert sich die Amplitude des Elektronenstrahls nur wenig.

Strukturinformationen sind hauptsächlich in einer Phasenänderung des Elektronenstrahls enthalten, d.h. der Phasenkontrast dominiert. Solche Proben nennt man Phasenobjekte. Die Phasenänderung des Elektronenstrahls kann in der herkömmlichen Hellfeldmikroskopie nicht direkt sichtbar gemacht werden: Hellfeldbilder von Phasenobjekten besitzen daher nur sehr geringen Kontrast (Abbildung 1).

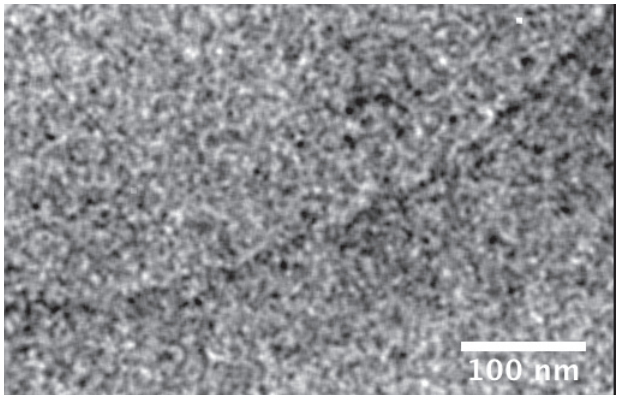


Abbildung 1: Hellfeld-TEM-Bild eines in amorphes Eis eingebetteten Liposom-Vesikels.

Phasenplatten können Phaseninformation sichtbar machen.

Phasenkontrast entsteht durch Interferenz zwischen ungestreuten und phasenverschobenen Elektronen. Ist die Phasenverschiebung gering, so entsteht kein oder ein nur sehr geringer Kontrast. Dies ist bei Phasenobjekten der Fall. Abbildung 2 zeigt den Kontrastverlauf in einem TEM. Dargestellt sind Kontrasttransferfunktionen (CTF) bei verschiedenen Mikroskopeinstellungen. Die CTF ist eine gerätespezifische Funktion und beschreibt den vom Gerät übertragenen Kontrast in Abhängigkeit von der Objektgröße. Die Objektgröße wird physikalisch als Frequenz dargestellt. Für die Abbildung biologischer Proben ist ein hoher Kontrast bei niedrigen Frequenzen (0,25 nm^{-1}– ca. 1,5 nm^{-1}) wichtig. Der blaue Graph stellt die CTF eines Phasenobjekts nahe der Fokusebene dar (-10 nm Defokus). Man erkennt, dass bei niedrigen Frequenzen die Kontrastübertragung gering ist. Um den Kontrast in der Praxis zu erhöhen, behilft man sich damit, stark defokussierte Bilder

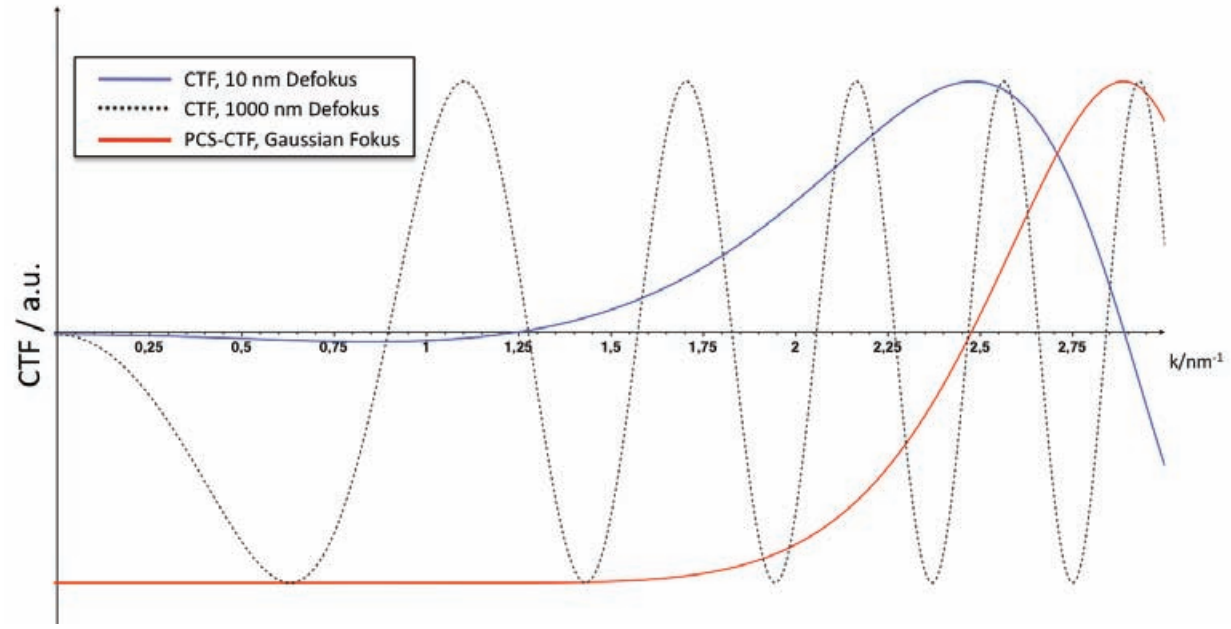


Abbildung 2: Simulierte Kontrasttransferfunktionen (CTF) mit und ohne Phasenkontrastsystem (PCS).

(500 – 10.000 nm Unterfokus) aufzunehmen; der übertragene Kontrast ist vom gewählten Defokus abhängig. Die schwarz gestrichelte Linie in Abbildung 2 stellt die CTF bei 1000 nm Unterfokus dar. Unter diesen Bedingungen sieht man Kontrastübertragung auch bei niedrigen Frequenzen, allerdings zu Lasten der Auflösung. Zudem hat diese CTF den Nachteil, dass sie sehr stark oszilliert und viele Nullstellen besitzt. An den Nullstellen der Funktion wird keine Bildinformation übertragen.

Bei einem Phasenkontrastsystem erhält ein Teil des Elektronenstrahls eine zusätzliche Phasenverschiebung. Dadurch ändert sich die Interferenz zwischen ungestreuten und phasenverschobenen Elektronen so, dass der übertragene Kontrast höher ist. (Entscheidend ist der absolute Wert (Betrag) der Kontrasttransferfunktion - roter Graph in Abbildung 2.) Der übertragene Kontrast ist maximal, wenn die zusätzliche Phasenverschiebung 90° beträgt. Dies macht man sich bei Phasenkontrastsystemen zunutze. Man sieht in Abbildung 2 die CTF einer Zernike-Phasenplatte. Die Kontrastübertragung für niedrige Frequenzen ist maximal bis zu einer Frequenz von etwa 2 nm^{-1}. Das bedeutet, es können Strukturen bis 0.5 nm kontrastreich abgebildet werden. Der Name dieser Phasenplatte leitet sich von Frits Zernike, einem niederländischen Physiker, ab. Zernike entwickelte 1930 das erste Phasenkontrastsystem für Lichtmikroskope, dessen Bedeutung jedoch zunächst völlig unterschätzt wurde [4]. Die deutsche Wehrmacht entdeckte im Zweiten Weltkrieg den Nutzen der Phasenkontrastsysteme und

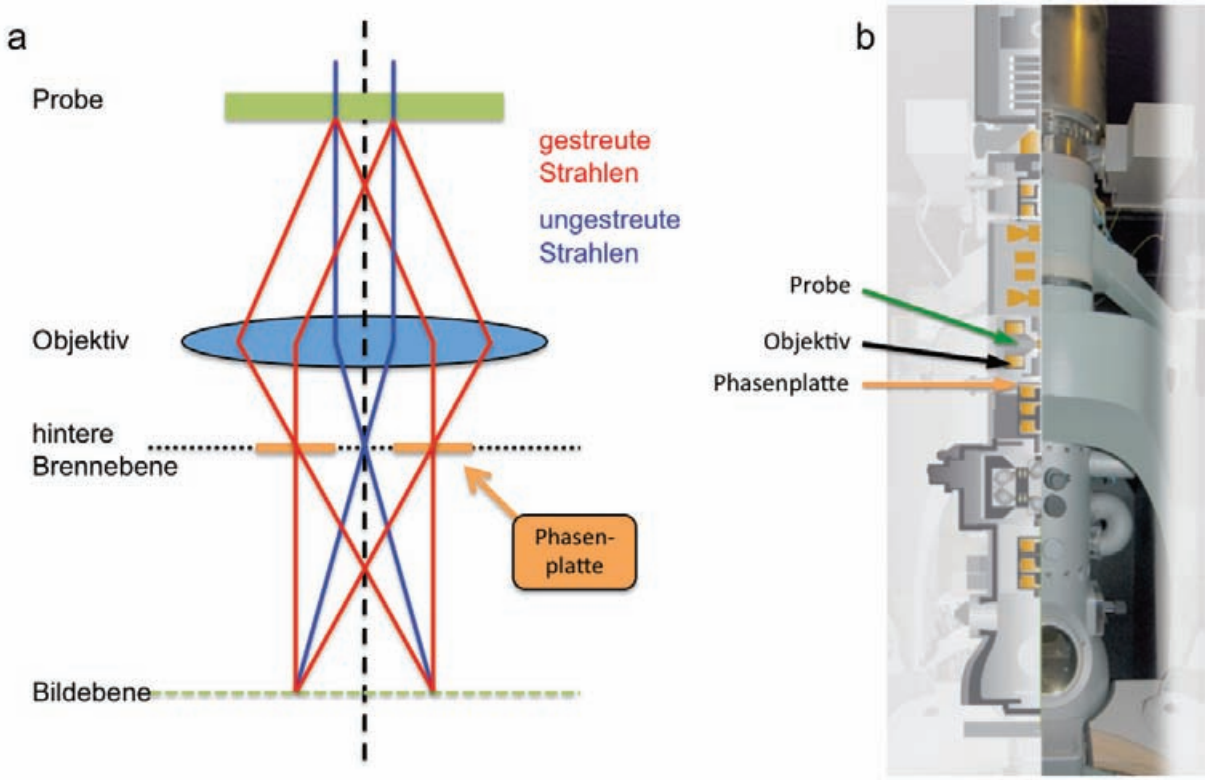


Abbildung 3: a. Strahlengang im TEM im Bereich des Objektivs. Eine Phasenplatte befindet sich in der hinteren Brennebene der Objektivlinse. **b. Schnittzeichnung eines TEM.** Positionen von Probe, Objektiv und Phasenplatte sind markiert.

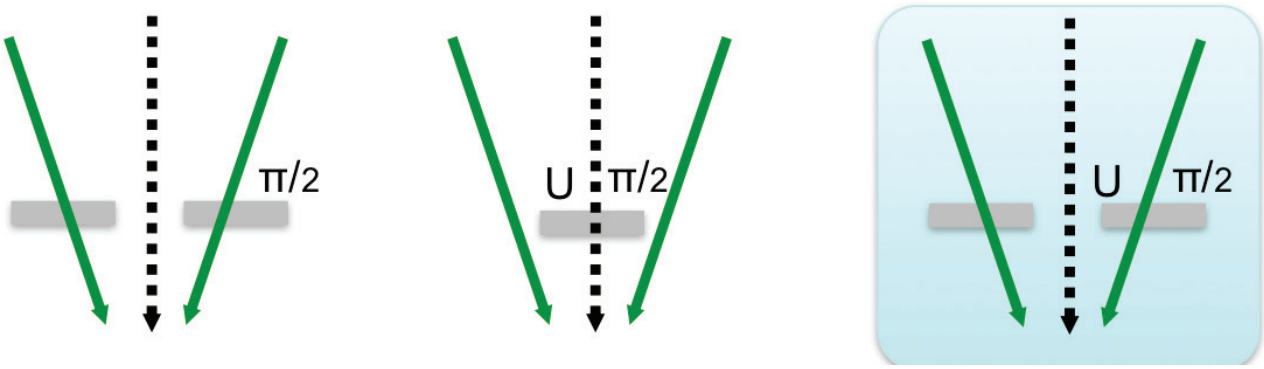


Abbildung 4: Verschiedene Phasenkontrastsysteme im TEM. Die beiden Hauptsysteme sind Zernike-Phasenplatten und Boersch-Phasenkontrastsysteme. Die KonTEM-Phasenplatte ist ein Hybrid aus beiden.

stellte die ersten Phasenkontrastmikroskope her. Später erwiesen sich solche Mikroskope in vielen Wissenschaftsbereichen, insbesondere der Medizin, als sehr nützlich. Zernike bekam für seine Arbeiten 1953 den Nobelpreis für Physik verliehen.

Funktionsprinzip einer Phasenplatte

In der Transmissionselektronenmikroskopie gab es seit den 1960er Jahren mehrere Versuche, Phasenplatten einzusetzen [5]. Es zeigten sich zunächst Probleme bei der Stabilität der Phasenplatten; diese Probleme verhinderten die breite Akzeptanz der Methode. Erst in den vergangen fünf Jahren wurden in verschiedenen Arbeitsgruppen ausreichend stabile Phasenplatten entwickelt. Nun konnten erste TEM-Experimente mit biologischen Proben durchgeführt werden [6; 7]. Allerdings sind auch diese Systeme noch nicht ausgereift genug, um sie im Routinebetrieb einzusetzen. Abbildung 3 a) zeigt den Strahlengang eines TEM im Bereich der Objektivlinse. Dargestellt sind die an der Probe gestreuten (rot) und die ungestreuten Strahlen (blau), die zusammen in der Bildebene ein vergrößertes Bild der Probe erzeugen. In der hinteren Brennebene der Objektivlinse (Beugungsebene) sind ungestreute und gestreute Elektronen räumlich getrennt. In dieser Ebene kann eine Phasenplatte positioniert werden.

Prinzipiell kann man zwei Arten von Phasenkontrastsystemen unterscheiden: Zernike-Phasenplatten und Boersch-Phasenkontrastsysteme (Abbildung 4). Eine Zernike-Phasenplatte besteht aus einem dünnen, gelochten Film. Die gestreuten Elektronen passieren den Film; ihre Phase verschiebt sich. Die ungestreuten Elektronen passieren das Loch; ihre Phase bleibt unverändert. Der Betrag, um den der Strahl verschoben wird, hängt vom inneren Potenzial der Phasenplatte ab. Dieses bestimmt sich durch Material und Dicke der Platte. In der Regel bestehen Zernike-Phasenplatten aus amorphen Kohlenstofffilmen. Für eine Phasenverschiebung von 90° müssen die Filme eine Dicke von 27 nm für Elektronen mit einer kinetischen Energie von 200 keV (35 nm bei 300 keV) besitzen. Da Kohlenstofffilme strahlempfindlich sind, verändern sich Zernike-Phasenplatten im TEM sehr schnell. Durch Kontamination ändert die Schicht ihre Dicke; die hohe Intensität des nicht gestreuten Strahls zerstört den Randbereich des Lochs. Dies begrenzt die Lebensdauer einer Zernike-Phasenplatte auf ca. 30 min. Bei Boersch-Phasenkontrastsystemen handelt es sich um elektrostatische Einzellinsen. Eine

ringförmige Linse wird um den ungestreuten Strahl platziert. An die Linse wird eine Spannung angelegt, wodurch die Phase des Elektronenstrahls verschoben wird. Der Betrag der Phasenverschiebung kann über das anliegende Potenzial eingestellt werden. Dies ist ein Vorteil gegenüber Zernike-Phasenplatten, bei denen der Betrag der Phasenverschiebung ausschließlich über das Material und die Filmdicke beeinflusst werden kann. Andererseits schneidet das Boersch-Phasenkontrastsystem einen Teil der Bildinformation aus, da sie im Bereich der Linse und deren Stützstruktur für den Elektronenstrahl undurchlässig ist. Nach derzeitigem Stand der Technik lassen sich Boersch-Phasenkontrastsysteme mit Stützstrukturen von etwa 1 µm Breite realisieren. Probendetails im Bereich von etwa 1 - 5 nm können mit diesen Systemen nicht abgebildet werden.

Die KonTEM-Phasenplatte verbindet die Konzepte von Boersch und Zernike. Sie besteht aus einem Materialfilm mit einem Loch für den nicht gestreuten Strahl. Der Film ist jedoch deutlich dünner, als die üblichen, auf Kohlenstoff basierenden Zernike-Filme. Derzeit wird ein Silizium-Film mit einer Dicke von ca. 5 nm verwendet. Die Transmissivität (Durchlässigkeit) dieses Phasenfilms wird dadurch um ca. 15 % erhöht, was insbesondere für die Kryo-TEM vorteilhaft ist. Auch die Nutzungsdauer der Filme ist im Vergleich zu klassischen Zernike-Phasenplatten deutlich höher, da Silizium im Elektronenstrahl stabiler als Kohlenstoff ist. Das innere Potenzial reicht bei 5 nm dicken Silizium-Filmen für eine Phasenverschiebung von 90° allerdings nicht aus. Um das fehlende Potenzial zu kompensieren, wird an den Film zusätzlich eine Spannung angelegt. Dadurch ist die Phasenverschiebung in einem begrenzten Bereich einstellbar.

Technische Umsetzung

Abbildung 5 zeigt einen der ersten Prototypen einer KonTEM-Phasenplatte aus Silizium. Der dort gezeigte Silizium-Chip besitzt neun Felder, in denen das Material nur 5 nm dick ist. In jedes dieser Felder wurde mit Hilfe eines *Focused Ion Beam*-Mikroskops ein Loch für den nicht gestreuten Strahl geschnitten. Für den Einbau und die Positionierung der Phasenplatten in der hinteren Brennebene des Objektivs haben wir einen speziellen Halter entwickelt. Dieser enthält eine Vorrichtung, um im TEM eine Spannung an die Phasenplatten anzulegen und so den Betrag der Phasenverschiebung einstellen zu können (Abbildung 6). Mit dieser Phasenplatte-Halter-Kombination konnten

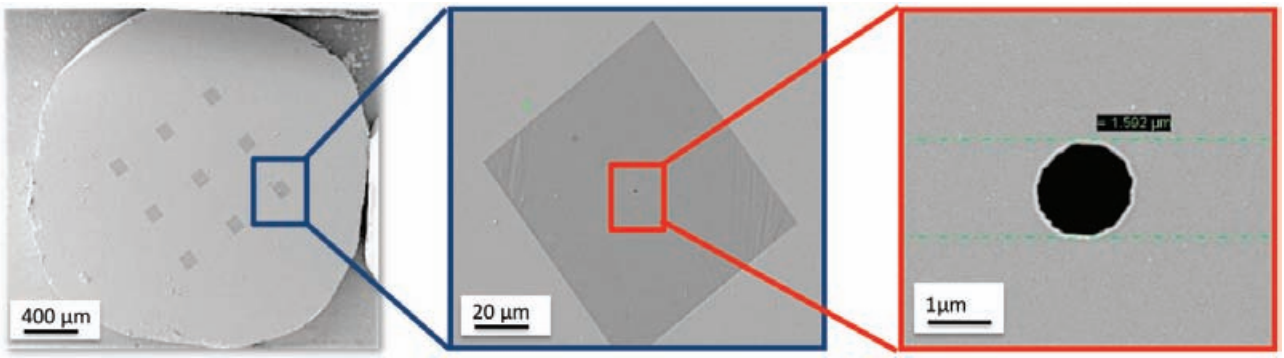


Abbildung 5: KonTEM-Silizium-Phasenplattenchip. Der Chip hat einen Durchmesser von 3 mm und neun gedünnte Felder (200 µm Kantenlänge) für Phasenplatten. In die gedünnten Felder des Phasenplattenchips wurde mit Hilfe eines FIB-Mikroskops je ein Loch mit einem Durchmesser von 1 µm geschnitten.

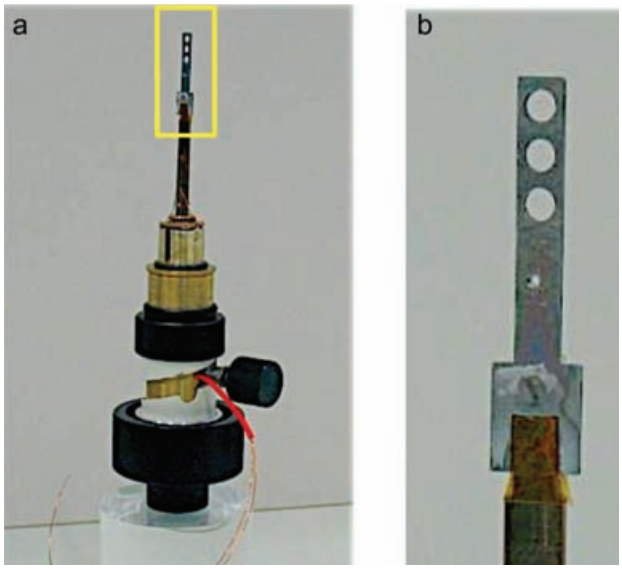


Abbildung 6: Prototyp eines mechanischen Phasenplattenhalters. Die Positionierung erfolgt über Mikrometerschrauben. Es können drei verschiedene Phasenplatten oder Blenden positioniert werden. Zusätzlich können zwei verschiedene Spannungen angelegt werden.

wir erste Versuche durchführen und das prinzipielle Funktionieren der KonTEM-Phasenplatte zeigen. Als Probe dienten wässrige, vitrifizierte Liposom-Suspensionen. Die Liposome hatten eine mittlere Größe von 100 nm.

In Abbildung 7 sieht man Bilder mit und ohne Phasenplatte unter ansonsten vergleichbaren Bedingungen. Bei Verwendung einer Phasenplatte zeigt sich ein deutlich besserer Kontrast als bei konventionellen Hellfeldaufnahmen. Im Verlauf der Experimente stellte sich heraus, dass das schnelle, exakte Positionieren der Phasenplatte für das Gelingen der Experimente von entscheidender Bedeutung ist. Aus diesem Grund wird derzeit ein motorisierter Halter entwickelt, mit dem eine genauere und schnellere Positionierung der Phasenplatte im Elektronenstrahl möglich sein wird.

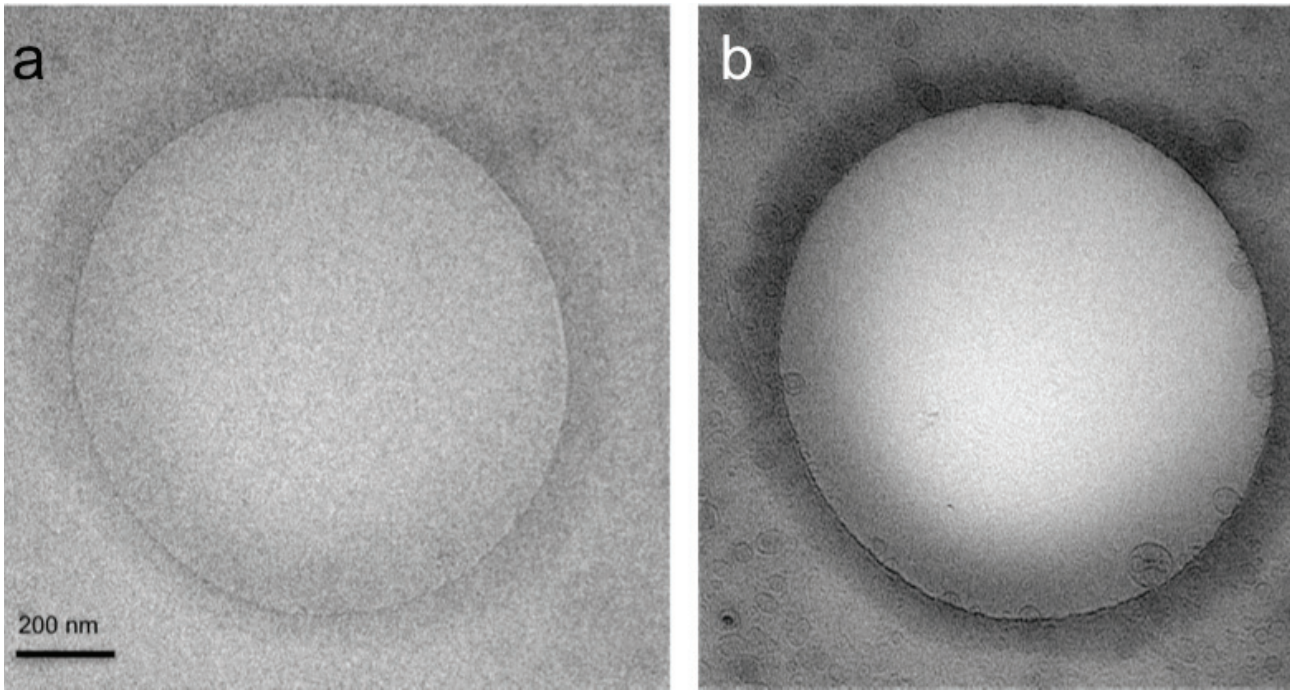


Abbildung 7: Vergleich zwischen herkömmlichem Hellfeld- und Phasenkontrast. a. In Eis eingebettete Liposome als Hellfeldabbildung nahe der Fokusebene. **b.** Dieselbe Probe im Fokus unter Verwendung einer Phasenplatte.

Ausblick

Es konnte gezeigt werden, dass die KonTEM-Phasenplatte zu einer Verbesserung des Kontrasts von Phasenobjekten führt. Die Stabilität der Silizium-Phasenfilme war dabei deutlich höher als bei vergleichbaren Kohlenstofffilmen.

Das Projekt wird im Rahmen des Programms *EXIST-Forschungstransfer* als Ausgründungsprojekt vom Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie gefördert. Ziel ist es, die KonTEM-Phasenplatte zu einem modularen, für den Routinebetrieb geeigneten System zu entwickeln, das in neue und bestehende TEMs eingebaut werden kann.

Referenzen

[1] Kisielowski, C. *et al.* (2008) "Detection of Single Atoms and Buried Defects in Three Dimensions by Aberration-Corrected Electron Microscope with 0.5 Å Information Limit" *Microsc. Microanal.* 14, 469-477

[2] Baumeister, W. (2002) "Electron Tomography: Towards Visualizing the Molecular Organization of the Cytoplasm" *Current Opinion in Structural Biology* 12, 679-684

[3] Danev, R. and Nagayama, K. (2001) "Complex Observation in Electron Microscopy. II. Direct Visualization of Phases and Amplitudes of Exit Wave Functions" *Journal of the Physical Society of Japan* 70, 696-702

[4] Zernike, F. (1935) „Das Phasenkontrastverfahren bei der mikroskopischen Beobachtung" *Z. techn. Physik* 16, 454-457

[5] Nagayama, K. and Danev, R. (2008) "Phase contrast electron microscopy: development of thin-film phase plates and biological applications" *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 363, 2153-2162

[6] Barton, B., Joos, F., and Schröder, R.R. (2008) "Improved specimen reconstruction by Hilbert phase contrast tomography" *J. Struct. Biol.* 164, 210-220

[7] Danev, R. and Nagayama, K. (2008) "Single particle analysis based on Zernike phase contrast transmission electron microscopy" *J. Struct. Biol.* 161, 211-218

Schalten von Nervenzellen mit Licht - eine neue Methode in der Epilepsieforschung

MANFRED LACHER
Mikrosystemtechnologie

Mit Licht kann man die Aktivität von Nervenzellen an- und ausschalten. Damit beschäftigt sich das neue Gebiet der Optogenetik. Wir entwickeln eine Optoelektrodensonde („Mausgehirnstecker"), mit der Nervenzellen im Mausgehirn optisch stimuliert und die daraus resultierenden elektrischen Signale gemessen werden können. Dafür setzen wir mikrotechnologische Sensoren ein und arbeiten mit telemetrischer Datenübertragung an lebenden Tieren. Ein Ziel ist es, die Mechanismen für neuronale Synchronisation und Krankheiten wie Epilepsie besser zu verstehen.

Grundlage für die Optogenetik war die Entdeckung von lichtabhängigen Ionenkanälen, den *Channelrhodopsinen*, in den Jahren 2002/2003 durch Ernst Bamberg, Direktor am Max-Planck-Institut für Biophysik, Georg Nagel, Universität Würzburg, und Peter Hegemann, Humboldt-Universität Berlin. Die Wissenschaftler fanden die Channelrhodopsine erstmals in einer einzelligen Grünalge; sie spielen dort eine wichtige Rolle bei der *Phototaxis*, also der Bewegung der Alge in Richtung einer Lichtquelle oder von ihr weg. Channelrhodopsine lassen sich auch in andere erregbare Zellen einführen, wodurch eine gezielte Stimulation der Zellen ermöglicht wird [1,2,3,4,5,6]. Diese „Photostimulation" ist sowohl in Zellkulturen (*in vitro*) als auch am lebenden Tier (*in vivo*) möglich. In Nervenzellen etwa können auf diese Weise Ionenkanäle mit Licht einer Wellenlänge von ca. 480 nm geöffnet werden; die Nervenzelle wird „angeschaltet". Entsprechend bewirkt das Protein Halorhodopsin das Schließen der Ionenkanäle bei Wellenlängen von ca. 570 nm; die Nervenzelle wird „ausgeschaltet". Es können mit dieser Technik aber nicht nur einzelne Nervenzellen, sondern ganze neuronale Netzwerke im Gehirn stimuliert werden - und das elektrodenfrei.

Das Hauptsymptom von Epilepsien sind wiederkehrende Anfälle, die zu einer neuronalen Schädigung und neurologischen Defiziten führen können. Ein epileptischer Anfall wird auf zellulärer Ebene durch eine spontane synchronisierte Entladung von großen Neuronengruppen ausgelöst. Ein Ziel der Epilepsieforschung ist, die Mechanismen für neuronale Synchronisation besser zu verstehen und dadurch neue Strategien zu entwickeln, um die Anfälle besser kontrollieren zu können. Die Komplexität der neuronalen Netzwerke im Gehirn erlaubt jedoch nur langsame Fortschritte im Verständnis dieser Synchronisationsprozesse [7,8,9,10]. Bisher verwendete, elektroden-basierte Stimulations- und Ableittechniken sind zur Analyse eines derartig komplexen Gewebes mit einer Vielzahl verschiedener Zelltypen und komplexen Verbindungen nur bedingt geeignet. Der Grund dafür ist, dass diese Techniken

lediglich die Stimulation und Vermessung weniger Nervenzellen zulassen. Die neue, lichtbasierte Stimulationstechnik erlaubt hingegen die Anregung auch größerer Neuronenverbände.

In Kooperation mit Prof. Dr. Heinz Beck von der Bonner Klinik für Epileptologie soll ein solcher „Lichtschalter" genutzt werden, um Epilepsie auf der Netzwerkebene besser zu verstehen. Es sollen transgene Mausgehirne optogenetisch stimuliert und die elektrischen Signale der Neuronen *in vivo,* d.h. am intakten Gehirn frei beweglicher Mäuse, gemessen werden. Wir hoffen, mit dieser Methode einen wesentlichen Fortschritt gegenüber den *in vitro* Untersuchungen an „in Scheibchen geschnittenen" Gehirnen zu erzielen.

Folgende Frage scheint naheliegend: Könnte man mit optogenetischen Methoden nicht auch kranke Nervenzellen im menschlichen Gehirn behandeln? So könnte man zum Beispiel im Gehirn von Epilepsie- oder Parkinson-Patienten Nervenzellen mit Hilfe von lichtleitenden Glasfasern nach Bedarf kontrolliert „an- oder abschalten", um den entsprechenden Krankheitsphänomene entgegen zu wirken, also eine Art „Gehirnschrittmacher" zu entwickeln. Ob diese wissenschaftliche Vision jemals erreichbar sein wird, weiß man nicht. Zunächst wollen wir zeigen, dass eine optische Stimulation von Neuronen am lebenden Tier mit Signalmessung und telemetrischer Datenübertragung aus technologischer Sicht überhaupt möglich ist.

„Mausgehirnstecker" – unser Konzept

Dieser Aufgabe stellten wir uns im Rahmen des von BMBF geförderten Vorlaufprojektes „Mausgehirnstecker" (Projektträger FZ Jülich). Unser Konzept: Ein System zur optischen An- und Abregung wird in einem „Zylinder" auf dem Kopf der Maus untergebracht. Zudem befinden sich in diesem „Zylinder" ein Vorverstärker und die Positioniereinheit mit Getriebe und Motor. Vom „Zylinder" aus werden die Daten an einen „Rucksack" per Kabel übermittelt, dort verarbeitet und dann über Funk an den Auswertungsrechner geschickt (Abbildung 1).

Ein System zur optischen An- und Abregung kombiniert mit einer elektrischen Vermessung wird als Optoelektrodensonde (kurz: Optrode) bezeichnet. Eine Optrode hat also zwei Aufgaben: Erstens soll sie Licht ins Gehirn leiten und die Nerven stimulieren, zweitens soll sie die daraus resultierenden elektrischen Potentiale messen. Wir stellen die Optrode aus Silizium her; sie enthält eine Glasfaser, eine LED und

Abbildung 1: Das Konzept des „Mausgehirnsteckers". Im „Zylinder" auf dem Kopf der Maus werden Neuronen im Mausgehirn optisch stimuliert. Die entstehenden elektrischen Signale werden per Kabel an den „Rucksack" und dann per Funk an den Rechner übertragen.

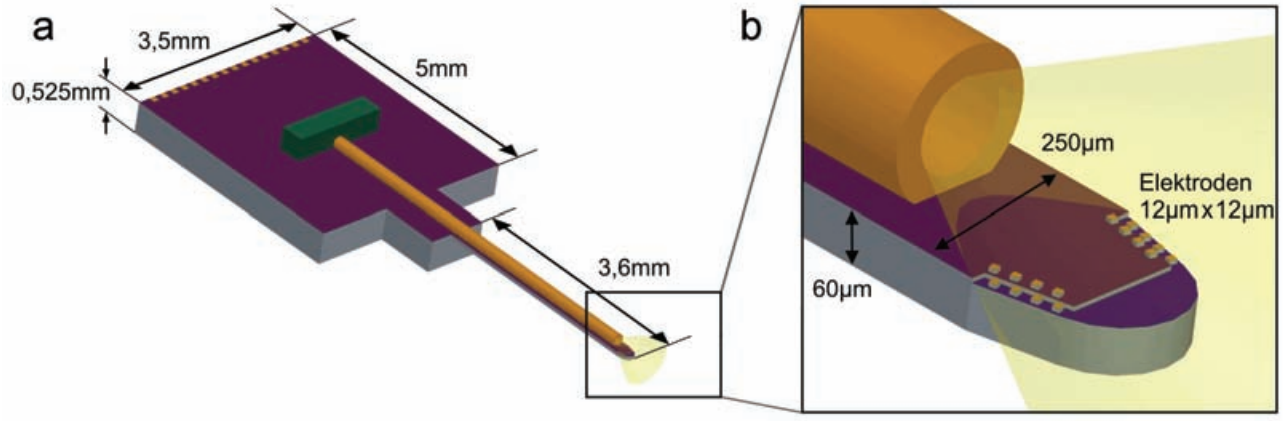


Abbildung 2: Der Aufbau der Optrode. a. Gesamtansicht. In eine Grube sind die Glasfaser und die LED geklebt. Die LED erzeugt Licht, das über die Glasfaser an die Spitze der Optrode geleitet wird. Die gesamte Optrode hat eine Länge von 9,6 mm, eine Breite von 3,5 mm und am hinteren Teil eine Dicke von 525 µm. **b.** Optrodenspitze mit Glasfaser-Ende und den Elektroden. Die 16 Elektroden aus Gold sind auf zwei Ebenen angeordnet und durch einen Isolator aus SiO_2 getrennt. Die Elektroden haben eine Kantenlänge von 12 µm und eine Dicke von 0,5 µm.

- an der Spitze - 16 Elektroden (Abbildung 2). Das von der LED erzeugte Licht wird über die Glasfaser an die Spitze der Optrode geleitet.

Abbildung 3 zeigt die fertiggestellte Optrode mit der Glasfaser, den Kontaktpads, den Zuleitungen zu den Elektroden sowie der eingeklebten LED. In Abbildung 4 sieht man, wie das Licht aus der Optrodenspitze austritt.

Die elektrische Funktion der Optrode wurde in ersten Tests untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die Optrode Signale messen kann, die von einer nahegelegenen Signalelektrode aus gesendet wurden – und das in

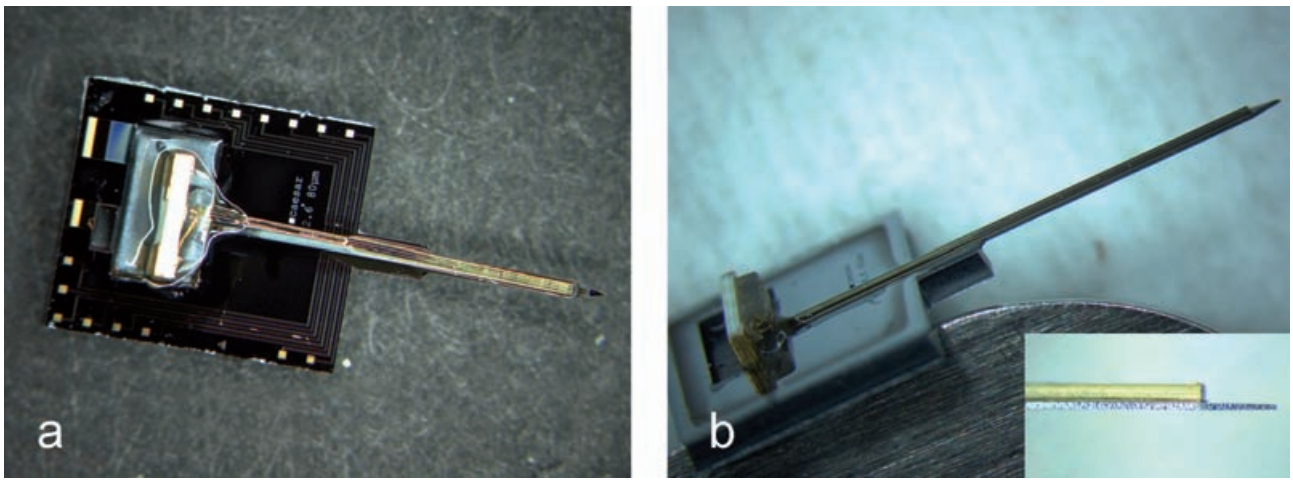


Abbildung 3: Fotos der fertiggestellten Optrode. a. Montierte Optrode in der Aufsicht. **b.** Seitenansicht der Optrode. Das Insert zeigt eine vergrößerte Seitenansicht der Optrodenspitze. Durch die Glasfaser wird die Optrodenspitze mechanisch stabilisiert.

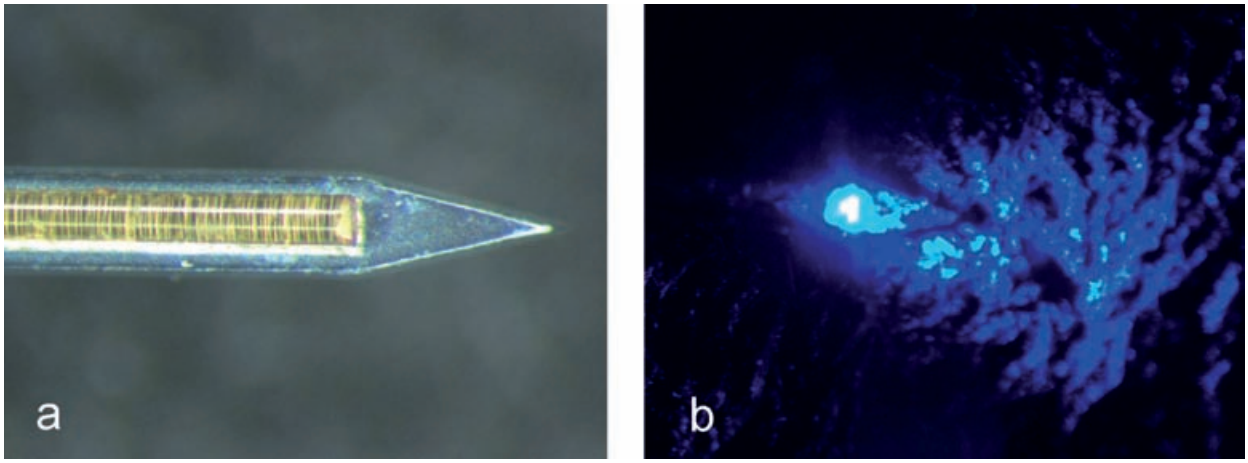


Abbildung 4: a. Aus der Glasfaser tritt das Licht aus und überstreicht die Optrodenspitze. b. Das Licht dringt kegelförmig in das angrenzende Gebiet (zukünftig Nervenzellen) ein.

hoher Präzision (Abbildung 5).

Datenübertragung

Ziel ist es, die elektrischen Signale der Nervenzellen mit der Optrode aufzunehmen, über einen AD Wandler an einen Mikrocontroller im „Rucksack“ zu leiten und dann telemetrisch an die Basisstation zu übertragen. Die Elektronik für die Datenverarbeitung und Übertragung wurde in zwei Blöcke unterteilt (Abbildung 6). Die „Basisstation“ ist ein stationärer PC, der über eine Funkübertragung mit dem mobilen Block auf der Maus kommuniziert. Der mobile Block besteht aus dem „Zylinder“ auf dem Kopf der Maus und dem „Rucksack“. „Zylinder“ und „Rucksack“ sind über ein Kabel verbunden. Die Komponenten im „Zylinder“ - Mikromotor, Vorverstärker und Optrode - werden über einen Mikrocontroller angesteuert, der sich im „Rucksack“ befindet. Neben dem Mikrocontroller sind

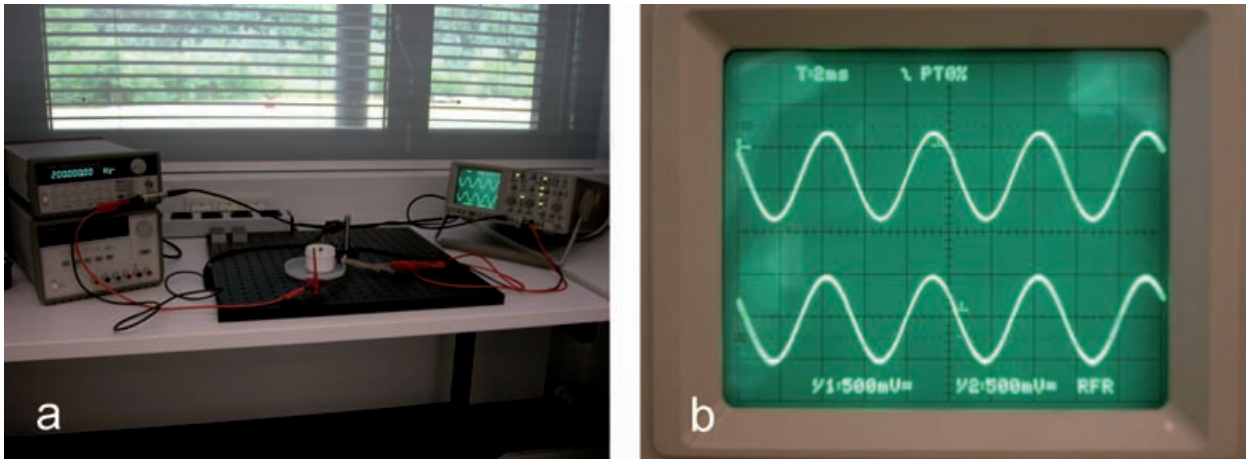


Abbildung 5: Funktionstest für die Optrode. a. Versuchsaufbau. Im Abstand von ca. 6 mm werden eine Signalsendeelektrode und die Optrode in einen Elektrolyten (Kochsalzlösung) getaucht. Gesendete bzw. empfangene Signale werden gemessen. **b.** Signalvergleich. Oben das mit einem Impulsgenerator auf die Signalsendeelektrode gegebene Sinussignal, unten das gemessene Signal an der Optrode. Beide Signale sind nahezu identisch.

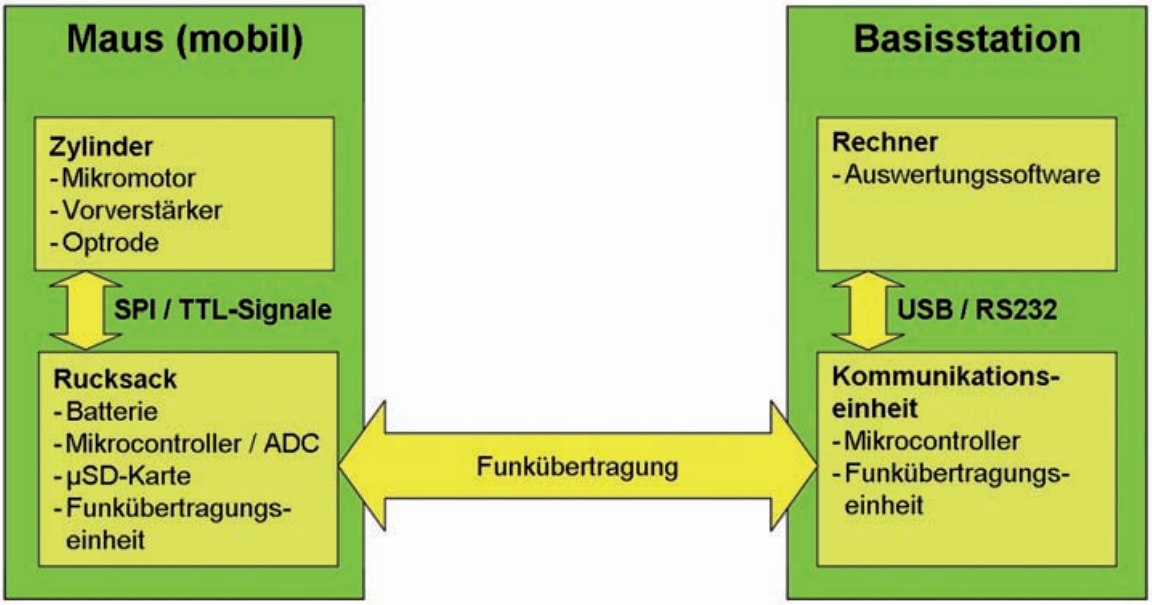


Abbildung 6: Prinzip der Datenübertragung zwischen der frei beweglichen Maus (mobiler Block) und der Basisstation. Die Komponenten im „Zylinder" werden über den „Rucksack" angesteuert. Über den „Rucksack" findet auch die Funkübertragung mit der „Basisstation", einem stationären PC, statt.

auch eine Funkübertragungseinheit und eine Batterie zur Energieversorgung im „Rucksack" untergebracht. Wichtige Kriterien an die Elektronik des mobilen Blocks sind Größe und Gewicht der Bauteile. Zugleich sollen an den 16 Messpunkten der Optrode eine Übertragungsrate von 10 kHz und eine Auflösung von 12 Bit gewährleistet sein. Falls die Bandbreite der Funkübertragung für die anfallende Datenmenge nicht ausreichen sollte, planen wir, eine µSD-Karte zur Zwischenspeicherung der Daten einzusetzen. Diese würde dann ebenfalls im „Rucksack" untergebracht werden. Die einzelnen Komponenten für die elektronische Motorsteuerung wurden erfolgreich getestet (Abbildung 7 a).

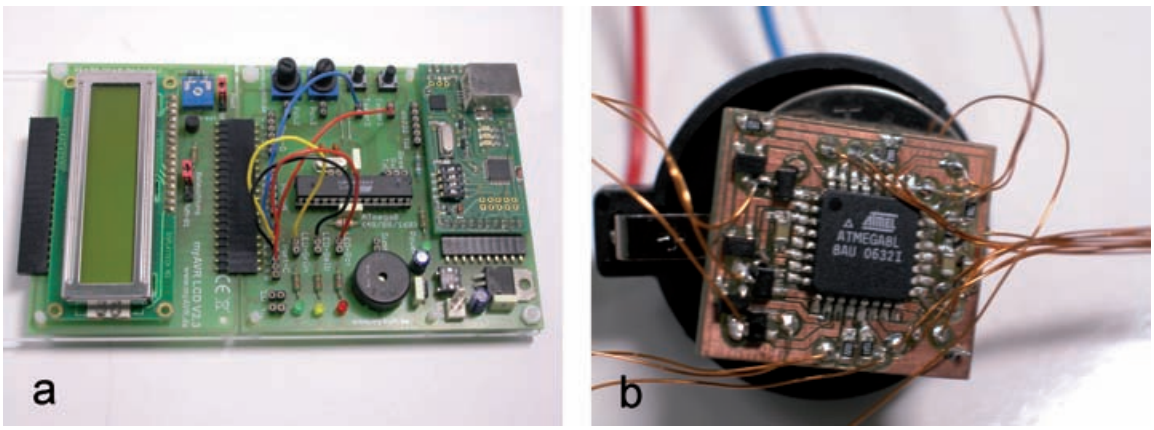


Abbildung 7: Elektronik des mobilen Blocks. a. Testaufbau für die Motorsteuerung. **b.** Rucksackplatine mit Batterie. Der Rucksack soll den Durchmesser einer 3V-Knopfbatterie haben.

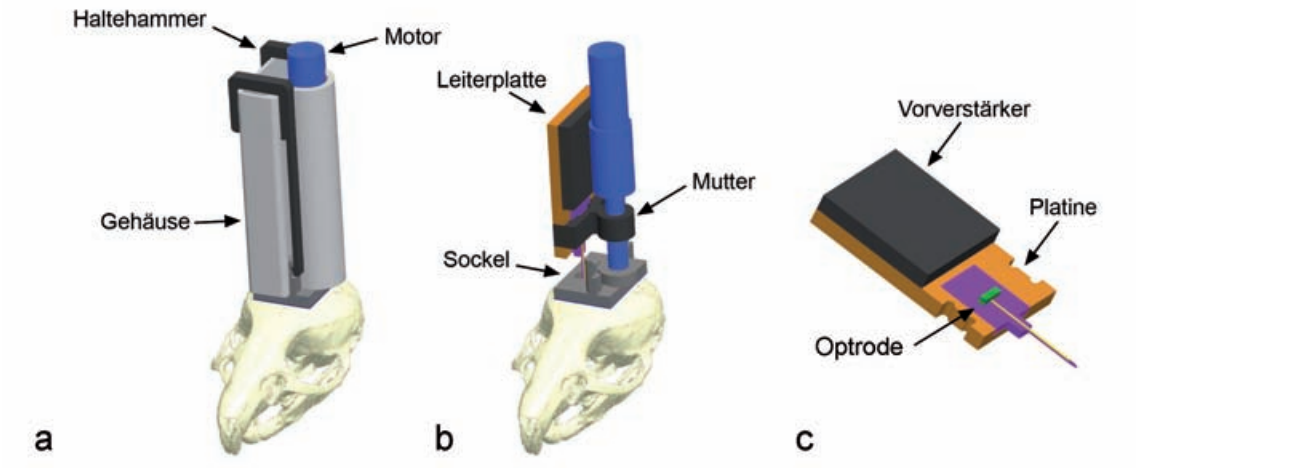


Abbildung 8: Konstruktionszeichnung des „Zylinders". a. Gesamteinheit. Der „Zylinder" ist insgesamt 22 mm hoch und ca. 8 g leicht. In dem Gehäuse aus Titan ist die gesamte Messeinheit untergebracht. **b.** Sockel, Motor mit Getriebe, Platine. Die Platine ist an der Spindel des Motors mit einer verfahrbaren Mutter befestigt und kann so als Gesamteinheit bewegt werden. Das Gehäuse ist über einen Bajonettverschluss auf einem Sockel befestigt. Der Sockel wird auf dem Mausschädel mit Zahnzement festgeklebt. **c.** Platine mit Signalverarbeitung. Auf der Platine befinden sich die Optrode und der Vorverstärker.

Der „Zylinder"

Die Optrode soll insgesamt maximal 3,6 mm tief in das Gehirn der Maus eingefahren werden, in der Endphase mit ca. 20 µm pro Tag. Dafür verwenden wir einen Mikromotor mit Getriebe und Spindel. Der Motor wird von dem externen Rechner telemetrisch angesteuert. Dadurch kann die Optrode kontrolliert und schonend in das Mausgehirn eingeführt werden. Die gesamte Messeinheit ist im „Zylinder", einem Gehäuse aus Titan, untergebracht (Abbildungen 8 und 9). Das Gehäuse wird auf einem Sockel befestig. Der Sockel wird stereotaktisch auf dem Mausschädel justiert und dann mit Zahnzement festgeklebt.

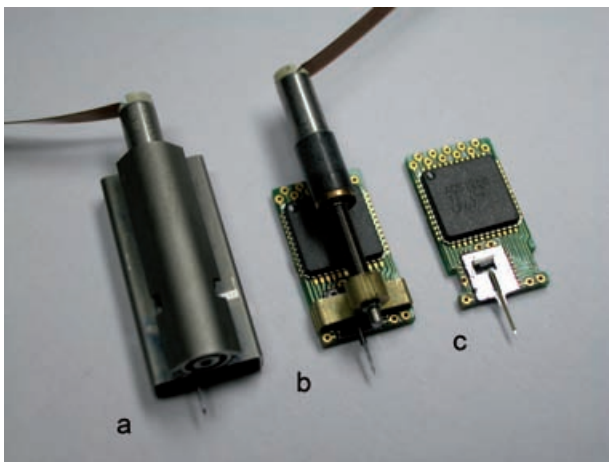


Abbildung 9: Aufbau des Zylinders. a. Gesamteinheit. **b.** Sockel, Motor mit Getriebe, Platine. **c.** Platine mit Signalverarbeitung.

Ausblick

In der EU leiden ca. 8 Millionen Menschen an Epilepsie. Unsere Forschungs- und Entwicklungsarbeiten sollen helfen, Fragen des komplexen Zusammenspiels der Neuronen zu beantworten, um so mittelfristig die Behandlung mit Medikamenten patientenspezifischer durchführen und langfristig - als Vision - vielleicht sogar einen „Gehirnschrittmacher" entwickeln zu können. Auf dem Weg zu diesem Ziel konnten wir grundlegende technologische Fragen klären. Weiterführende Arbeiten sind im Rahmen eines EU Projekts (Era-Net NEURON; Projektträger DLR, Bonn) mit weiteren Partnern aus Spanien, Frankreich und Israel geplant.

Referenzen

[1] Nagel, G., Ollig, D., Fuhrmann, M., Kateriya, S., Musti, A.-M., Bamberg, E., and Hegemann, P. (2002) „Channelrhodopsin-1, A Light-Gated Proton Channel in Green Algae“ *Science* 296, 2395-2398

[2] Nagel, G., Szellas, T., Huhn, W., Kateriya, S., Adeishvili, N., Berthold, P., Ollig, D., Hegemann, P., and Bamberg, E. (2003) “Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel” *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 13940-13945

[3] Li, X., Gutierrez, D.V., Hanson, M.G., Han, J., Mark, M.D., Chiel, H., Hegemann, P., Landmesser, L.T., and Herlitze, S. (2005) “Fast noninvasive activation and inhibition of neural and network activity by vertebrate rhodopsin and green algae channelrhodopsin” *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 17816-17821

[4] Boyden, E.S., F. Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G., and Deisseroth, K. (2005) “Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity” *Nature Neuroscience* 8, 1263-1268

[5] Zhang, F., Wang, L., Brauner, M., Liewald, J. F., Kay, K., Watzke, N., Wood, P. G., Bamberg, E., Nagel, G., Gottschalk, A., and Deisseroth, K. (2007) “Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry” *Nature* 446, 633-639

[6] Nagel, G., Brauner, M., Liewald, J.F., Adeishvili, N., Bamberg, E., and Gottschalk, A. (2005) “Light-activation of Channelrhodopsin-2 in excitable cells of Caenorhabditis elegans triggers rapid behavioral responses” *Current Biology* 15, 2279-2284

[7] Remy, S., Csicsvari, J., and Beck, H. (2009) “Activity-dependent control of neuronal output by local and global dendritic spike attenuation” *Neuron* 61, 906-916

[8] Otte, D.M., Bilkei-Gorzó, A., Filiou, M.D., Turck, C.W., Yilmaz O., Holst, M.I., Schilling, K., Abou-Jamra, R., Schumacher, J., Benzel, I., Kunz, W.S., Beck, H., and Zimmer, A. (2009) “Behavioral changes in G72/G30 transgenic mice” *Euro. Neuropsychopharmacol.* 19, 339-348

[9] Wiese, C., Rolletschek, A., Kania, G., Navarrete-Santos, A., Anisimov, S.V., Steinfarz, B., Tarasov, K.V., Brugh, S.A., Zahanich, I., Rüschenschmidt, C., Beck, H., Blyszczuk, P., Czyz, J., Heubach, J.F. Ravens, U., Horstmann, O., St-Onge, L., Braun, T., Brüstle, O., Boheler, K.R., and Wobus, A.M. (2006) “Signals from embryonic fibroblasts induce adult intestinal epithelial cells to form nestin positive cells with proliferation and multilineage differentiation capacity in vitro” *Stem Cells* 24, 2085-2097

[10] Remy, C., Remy, S., Beck, H., Swandulla, D., and Hans, M. (2004) “Modulation of voltage-dependent sodium channels by the delta-agonist SNC80 in acutely isolated rat hippocampal neurons” *Neuropharmacology* 47, 1102-1112

Berichte über abgeschlossene Doktorarbeiten

HCN Pacemaker Channels in the Mouse Brain

ANNUKKA AHO
Molekulare Neurosensorik

The hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated (HCN) channels are activated by hyperpolarization of the membrane and are regulated by cyclic nucleotides. In mammals, four HCN isoforms have been identified (HCN1-HCN4). Each of the four HCN isoforms shows a distinct expression pattern in the brain with considerable overlap between the different isoforms in many regions of the brain. The properties of native HCN currents differ from those of heterologously expressed, homomeric (i.e. composed of one isoform) HCN channels. This could be explained by the occurrence of heteromeric HCN channels, which are composed of different HCN isoforms. Our data show that HCN channels form heteromers *in vitro* and *in vivo*, and that heteromeric channels exhibit novel properties.

Ion channels are integral membrane proteins that enable cells to communicate with their environment. They form water-filled pores through which ions can flow into or out of the cell. The exact properties of ion channels are crucial for the correct functioning of the nervous system. HCN channels are activated by hyperpolarization of the cell's membrane and are regulated by the binding of cyclic nucleotides [1].

HCN channels are tetramers consisting of four subunits (figure 1); therefore, they could be composed of either the same HCN isoform (homomeric channels) or of different HCN isoforms (heteromeric channels). Heteromeric HCN channels have so far only been investigated in a few studies, most of which used heterologous expression systems such as HEK293 cells or *Xenopus* oocytes. Therefore we conducted a comprehensive study of heteromeric HCN channels in the mouse brain. We used co-immunoprecipitation (co-IP; figure 2) to study which HCN isoforms can be co-precipitated. For the co-IPs, we used membrane proteins from four different brain regions: olfactory bulb, hippocampus, cerebellum and ventral-/midbrain. An example of

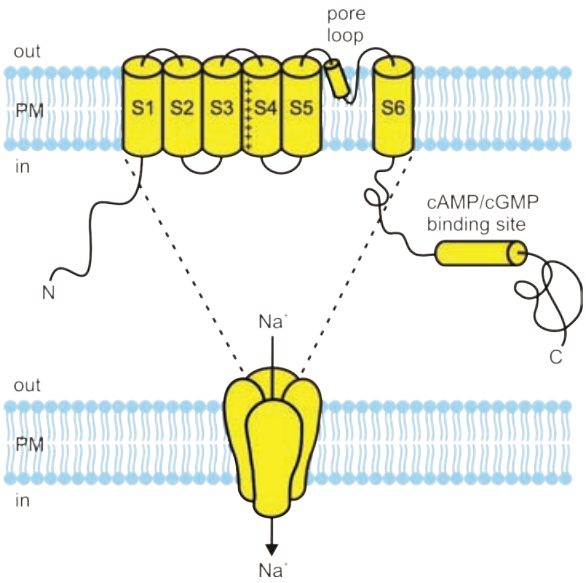


Figure 1: Transmembrane topology and subunit stoichiometry of HCN channels. HCN channels encompass six transmembrane domains (S1-S6), a pore loop between S5 and S6, as well as a binding site for cyclic nucleotides (cAMP or cGMP). The N and C termini are located intracellularly (in). The voltage sensor in S4 is marked with +. PM: plasma membrane.

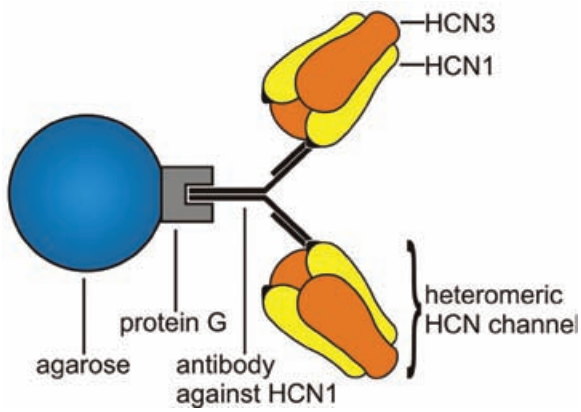


Figure 2: Principle of co-immunoprecipitation. An antibody is coupled to a protein G/agarose resin. The antibody binds (= precipitates) the HCN isoform that it is directed against, and co-precipitates all other proteins that are in close contact with the precipitated HCN isoform (such as other HCN channel subunits).

such a co-IP is shown in figure 3. Here, HCN1 was precipitated, and HCN2, HCN3 and HCN4 were co-precipitated. As a control, membrane proteins from an HCN1 knock-out mouse were used. These mice do not express the HCN1 protein, therefore they cannot possess heteromeric channels containing HCN1. As a result, no HCN protein should be co-precipitated with the HCN1 antibody. By combining co-immunoprecipitations with antibodies against all four HCN isoforms, we were able to show that all possible combinations of two different HCN isoforms can be found in the brain (table 1).

HCN channels fulfill numerous tasks in the brain. Most importantly, HCN channels control the rhythmic activity of neurons [1, 2]. For this reason they have been designated pacemaker channels. We are especially interested in the function of HCN channels in the olfactory bulb, a special region of the brain where the information from the olfactory sensory cells of the nose is processed and then relayed to higher brain centers [3]. Here, the four HCN channel isoforms are abundantly expressed in distinct subsets of cells,

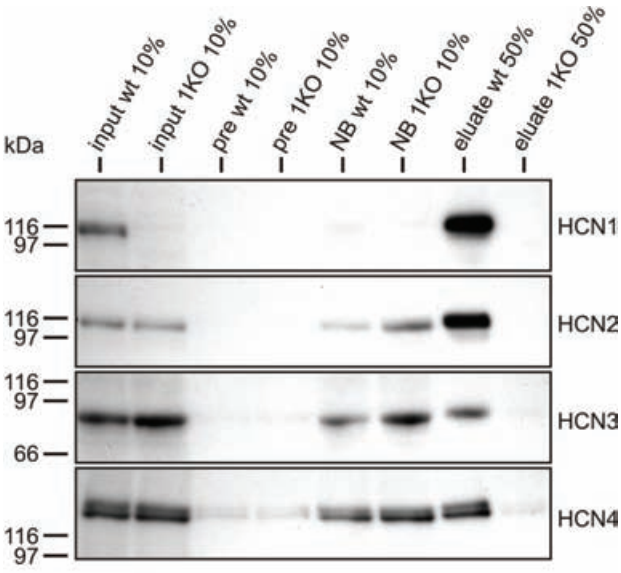


Figure 3: Western Blot analysis of a co-immunoprecipitation experiment. Membrane proteins from the olfactory bulb of wildtype and HCN1 knock-out mice were prepared and preincubated with the protein G/agarose resin. Afterwards, the preincubated membrane proteins were incubated with an HCN1 antibody immobilized to the protein G/agarose resin. The supernatant containing all proteins that did not bind to the antibody was removed and after several wash steps, the proteins bound to the antibody were eluted. The indicated amount of each fraction (given as % of the total fraction volume) was loaded onto an SDS-polyacrylamide gel, blotted onto a PVDF membrane and detected immunologically. The molecular weights of the reference proteins are shown on the left in kDa. wt: wildtype; 1KO: HCN1 knock-out; pre: preincubation; NB: non-bound fraction.

and often different HCN isoforms are co-expressed within the same cell [4].

One feature of the olfactory bulb that seems to be crucial for information processing is the occurrence of oscillations [5]. There are two ways in which HCN channels could play a role in the generation of oscillations in the olfactory bulb: First, HCN channels could act as primary pacemakers by determining the frequency with which action potentials are fired. Alternatively, HCN channels could tune a cell's passive properties such as the resting membrane potential or

Brain region	Combination
Olfactory bulb	HCN1+HCN2, HCN1+HCN3, HCN1+HCN4, HCN2+HCN3, HCN2+HCN4, HCN3+HCN4
Hippocampus	HCN1+HCN2, HCN1+HCN3, HCN1+HCN4, HCN2+HCN3, HCN2+HCN4, HCN3+HCN4
Cerebellum	HCN1+HCN2, HCN1+HCN3, HCN1+HCN4, HCN2+HCN3, HCN2+HCN4
Ventral-/ midbrain	HCN1+HCN2, HCN1+HCN3, HCN1+HCN4, HCN2+HCN3, HCN2+HCN4, HCN3+HCN4

Table 1: HCN isoform combinations that form heteromeric channels in different brain regions of the mouse (determined by co-immunoprecipitation).

the resonance (which is a property that describes the ability of neurons to respond selectively to inputs at preferred frequencies), thereby influencing how the cell responds to network activity.

Literature

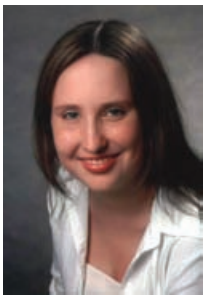
[1] Kaupp, U.B. and Seifert, R. (2001) "Molecular diversity of pacemaker ion channels" *Annu. Rev. Physiol.* 63, 235-257

[2] Robinson, R.B. and Siegelbaum, S.A. (2003) "Hyperpolarization-activated cation currents: from molecules to physiological function" *Annu. Rev. Physiol.* 65, 453-480

[3] Kaupp, U.B. (2010) "Olfactory signalling in vertebrates and insects: differences and commonalities" *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 188-200

[4] Fried, H.U., Kaupp, U.B., and Müller, F. (2010) "Hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated channels are differentially expressed in juxtaglomerular cells in the olfactory bulb of mice" *Cell Tissue Res.* 339, 463-479

[5] Lledo, P.M., Gheusi, G., and Vincent, J.D. (2005) "Information processing in the mammalian olfactory system" *Physiol. Rev.* 85, 281-317



Annukka Aho studied biology at WWU Münster. In December 2006, she received her diploma for a work on the FGF-receptor and its effect on the regulation of glial cell number in the nervous system of *Drosophila*. She moved to Forschungszentrum Jülich in March 2007 where she worked with Prof. U.B. Kaupp on the expression, composition and function of HCN pacemaker channels in the mouse brain. Since April 2008, she has continued her work with Prof. Kaupp at caesar. She received her Ph.D from the University of Cologne in April 2010. During her graduate studies, she has been a member of the IHRS BioSoft and was supported by a scholarship from the Boehringer Ingelheim Fonds (B.I.F.).

Der Unfruchtbarkeit auf der Spur

MIRIAM KRÄHLING
Molekulare Neurosensorik

Kinderkriegen – die einfachste Sache der Welt? Nicht für alle: In Deutschland bleiben mehr als 10% der Paare mit Kinderwunsch innerhalb eines Jahres kinderlos. Während man vor einigen Jahrzehnten noch der Meinung war, dass Kinderlosigkeit immer auf eine Unfruchtbarkeit der Frau zurückzuführen ist, weiß man heute, dass in ca. 40% der Fälle die Ursache beim Mann zu finden ist.

Unfruchtbarkeit beim Mann kann verschiedene Gründe haben: Missbildungen im Urogenitaltrakt, Infektionen, Hormonstörungen, genetische oder auch immunologische Faktoren. In 50% der Fälle ist die Ursache jedoch unbekannt; man spricht von idiopathischer Infertilität. Diese ist oft dadurch gekennzeichnet, dass die Entwicklung der Spermien, die Spermatogenese, gestört ist.

Wie verläuft die Spermatogenese beim gesunden Mann? Die Spermatogenese beginnt mit den Stammzellen, den sogenannten Spermatogonien (Abbildung 1). Diese besitzen – wie alle anderen Zellen im Körper auch – einen doppelten Chromosomensatz. Aus den Spermatogonien entwickeln sich fortwährend Spermatozyten. Diese teilen sich, so dass Zellen mit nur noch einem Chromosomensatz entstehen – die runden Spermatiden. In der letzten Phase der Spermatogenese ändern die Spermatiden ihre Form (Morphologie) beträchtlich und entwickeln sich zu Spermien. Diese werden in den Nebenhoden transportiert, wo sie ihre Reifung beenden.

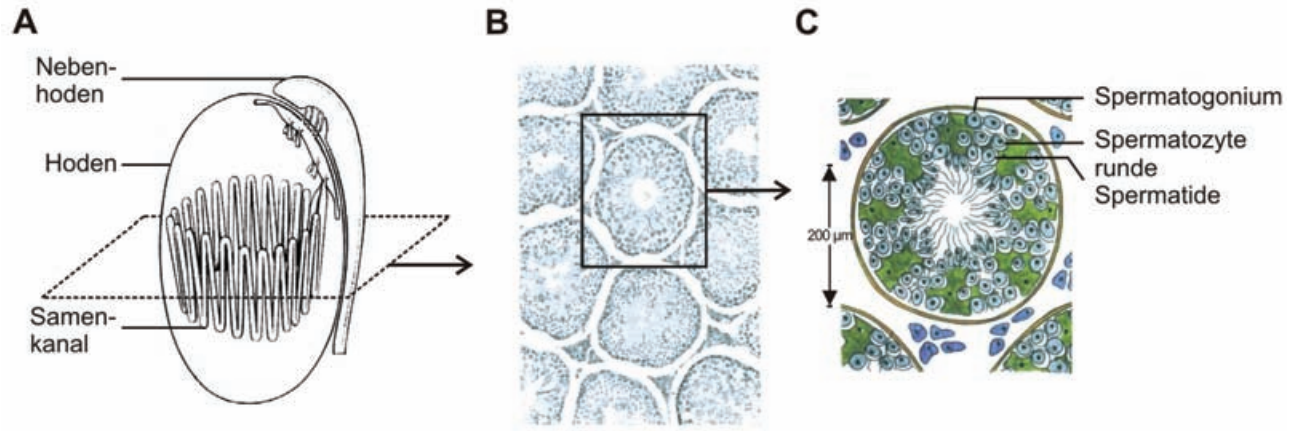


Abbildung 1: Hoden und Nebenhoden der Maus. A. Schematische Darstellung des Hodens und des anliegenden Nebenhodens. **B.** Lichtmikroskopische Aufnahme eines Hodenquerschnitts [1]. **C.** Schematischer Querschnitt eines Samenkanals.

Den Ursachen für eine Unfruchtbarkeit bei Männern kommt man nur auf die Spur, wenn man die Abläufe der Spermatogenese auf molekularer Ebene untersucht: Das bedeutet, die an der Spermatogenese beteiligten Proteine zu identifizieren und deren Funktion zu verstehen. Der Bauplan für Proteine ist in der Erbinformation, der DNA, gespeichert. Für jedes Protein gibt es einen spezifischen DNA-Abschnitt und die zugehörige Kopie, die mRNA. In den letzten Jahren wurde die Erbinformation des Menschen und vieler Tierarten aufgeklärt. Durchsucht man die Erbinformationen mit Hilfe von Computerprogrammen, stößt man dabei auch auf Abschnitte, die die Informationen für bislang unbekannte Proteine enthalten. In unserer Abteilung wurde auf diese Weise ein neues Protein entdeckt [2], das in mindestens 36 verschiedenen Tierarten – von marinen Wirbellosen wie den Seeigeln bis hin zum Menschen – vorkommt. Verschiedene Eigenschaften machen dieses Protein für uns besonders interessant: 1) Laut Computervorhersage kommt es ausschließlich im Hoden vor. 2) Bei Männern mit missgebildeten Spermien ist die Expression dieses Proteins geringer als bei Männern mit normal entwickelten Spermien. 3) Ein Bereich des Proteins weist eine hohe Ähnlichkeit zu einer gut untersuchten Bindestelle für die zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP auf. Auf Grund dieser Ähnlichkeit haben wir das Protein *soluble cyclic nucleotide binding protein* (SCNBP) genannt. Zyklische Nukleotide sind an der Regulation vieler physiologischer Funktionen wie z. B. dem Riechen oder dem Sehen beteiligt [3, 4]. Auch in reifen Spermien spielen zyklische Nukleotide eine wichtige Rolle: Sie sind sowohl entscheidend für die Bewegungsfähigkeit der Spermien als auch für deren gerichtete Bewegung zur Eizelle hin [5, 6, 7]. Ob cAMP oder cGMP jedoch eine Rolle während der Spermatogenese spielen, ist unklar. Das SCNBP

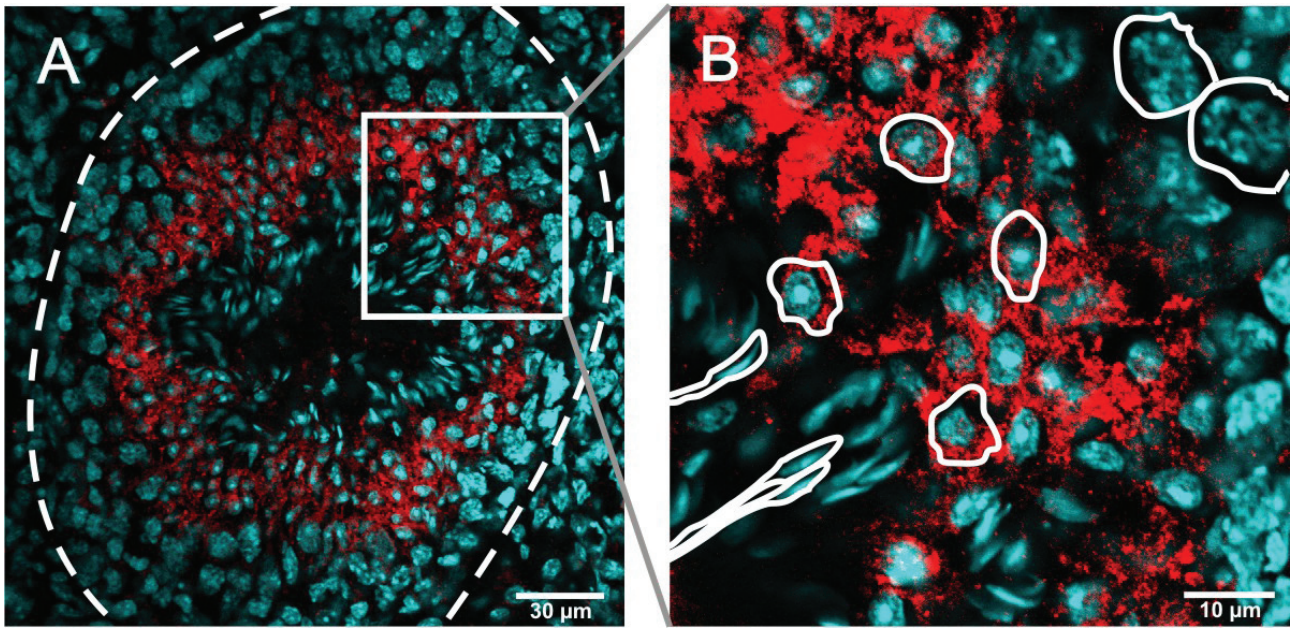


Abbildung 2: Immunhistochemische Färbung an einem Gefrierschnitt eines Maushodens. A. Querschnitt eines Samenkanals. Das SCNBP ist in rot, der Zellkern in cyan gefärbt. Die Membran, die den Samenkanal umgibt, ist mit einer gestrichelten Linie angedeutet. **B.** Ausschnitt aus A. Die Umrisse einiger Zellen sind mit Linien angedeutet.

könnte während der Spermatogenese eine wichtige Funktion haben, die über zyklische Nukleotide gesteuert wird.

Wie lässt sich die Funktion des SCNBPs während der Spermatogenese aufklären? Zunächst muss man wissen, wo genau das Protein lokalisiert ist. Ich konnte zeigen, dass das SCNBP im Menschen und in der Maus tatsächlich nur im Hoden, nicht aber in anderen Geweben vorkommt. Der Hoden enthält nicht nur Spermienvorläuferzellen, sondern auch Bindegewebs- und Stützzellen. Meine Ergebnisse zeigen, dass das Protein im letzten Stadium der Spermatozyten und in den ersten Stadien der Spermatiden vorhanden ist (Abbildung 2).

Welche Prozesse laufen spezifisch in späten Spermatozyten und runden Spermatiden ab, an denen das SCNBP beteiligt sind könnte? Zum einen bildet sich das Akrosom, ein Bläschen am Kopf des Spermiums. Trifft das Spermium auf eine Eizelle, werden Stoffe aus dem Akrosom abgegeben, die die Schutzhüllen der Eizelle auflösen, wodurch das Spermium die Eihülle leichter durchdringen kann. Zum anderen stoppt in diesen Spermienvorläuferstadien das Umschreiben der DNA in mRNA. Die mRNAs aller Proteine, die für die morphologischen Veränderungen in späten Spermatiden und für die Funktion reifer Spermien wichtig sind, müssen also schon in frühen Spermatiden hergestellt werden. Damit diese mRNAs nicht direkt für die Proteinsynthese verwendet werden, müssen sie in der Zelle gelagert werden. Auf Grund seiner spezifischen Verteilung in späten Spermatozyten und frühen Spermatiden könnte das SCNBP an den genannten Prozessen beteiligt sein.

Um die Funktion eines unbekannten Proteins im Organismus, d. h. *in vivo*, zu untersuchen, ist das Mittel der Wahl, das Protein *in vivo* auszuschalten. Für Säugetiere ist die Maus der Modellorganismus. In der Maus kann mit Hilfe der embryonalen Stammzelltechnologie jeder beliebige DNA-Abschnitt ausgeschaltet werden. In diesen sogenannten Knockout-Mäusen wird das entsprechende Protein nicht mehr hergestellt, da die Anleitung fehlt. Stellt man in den Knockout-Mäusen Veränderungen im Vergleich zu normalen Mäusen fest, so kann man auf die Funktion des Proteins schließen. Bei Proteinen, die eine wichtige Rolle in der Spermatogenese spielen, würde man z. B. erwarten, dass die jeweiligen Knockout-Mäuse unfruchtbar sind. In der Maus ist es nicht nur möglich, ein Protein auszuschalten, sondern auch die Proteinmenge unnatürlich zu erhöhen. In diesen „Überexpressionsmäusen“ kann man das Protein auch in Geweben herstellen lassen, in denen es normalerweise nicht vorkommt. Die Überexpressionsmäuse sind interessant, da viele Krankheiten durch vermehrte Herstellung eines Proteins ausgelöst werden.

In meiner Doktorarbeit ist es mir gelungen, sowohl eine Knockout-Mauslinie als auch eine Überexpressionsmauslinie für das SCNBP herzustellen. Untersuchungen an diesen Mäusen werden zeigen, ob das Fehlen oder die Überexpression des SCNBPs die Fertilität der Männchen beeinträchtigt. Sollten die Männchen tatsächlich unfruchtbar sein, gilt es zu klären, woran das liegt. Ist z. B. die Morphologie des Hodens verändert? Gibt es Unterschiede in der Spermatogenese? Werden überhaupt reife Spermien gebildet und wenn ja, zeigen diese ein normales Schwimmverhalten? All diese spannenden Fragen gilt es zu beantworten. Mit meiner Arbeit habe ich die Grundlage gelegt, diese Fragen zu klären, und kann so möglicherweise dazu beitragen, Ursachen für idiopathische Infertilität bei Männern zu identifizieren.

Referenzen

[1] Maronpot, R.R., ed.: “Pathology of the mouse”, Saint Louis: Cache River Press, 1999

[2] Utzerath, S. (2003) „Identifizierung eines löslichen zyklisch-Nukleotid-Binde-Proteins“, Diplomarbeit: Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität zu Köln

[3] Kaupp, U.B. (2010) “Olfactory signalling in vertebrates and insects: differences and commonalities” *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 188-200

[4] Burns, M.E. and Arshavsky, V.Y. (2005) “Beyond counting photons: trials and trends in vertebrate visual transduction” *Neuron* 48, 387-401

[5] Harrison, R.A. (2003) “Cyclic AMP signalling during mammalian sperm capacitation-still largely terra incognita” *Reprod. Domest. Anim.* 38, 102-110

[6] Kaupp, U.B., Kashikar, N.D., and Weyand, I. (2008) „Mechanisms of sperm chemotaxis” *Annu. Rev. Physiol.* 70, 93-117

[7] Suarez, S.S. (2008) “Control of hyperactivation in sperm” *Hum. Reprod. Update* 14, 647-657

Miriam Krähling hat Biologie an der Georg-August-Universität Göttingen und der Universität zu Köln studiert. Im November 2006 hat sie ihr Diplom für ihre Arbeit zur Charakterisierung eines neuen Proteins mit einer Bindestelle für zyklische Nukleotide am Forschungszentrum Jülich erhalten. Dieses Projekt hat sie in ihrer Doktorarbeit bei Herrn Prof. U.B. Kaupp – zunächst im Forschungszentrum Jülich, später im Forschungszentrum caesar – weiter verfolgt. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe Waisman in Mainz hat sie für dieses Projekt mehrere transgene Mauslinien hergestellt. Im November 2009 hat sie ihren Doktortitel erhalten. Seit Dezember 2009 ist sie im Forschungszentrum caesar als wissenschaftliche Mitarbeiterin tätig.

Wenn man(n) auf Frau hört

Astrid Müller (geb. Loogen)
Molekulare Neurosensorik

Sie sind ein Mann? Mal ehrlich: Lassen Sie sich gerne von einer Frau den Weg vorschreiben? Während ein machohaftes „Ich weiß es besser!“ im menschlichen Alltag höchstens zu einem kleinen Beziehungsstreit führt, wäre ein solches Verhalten für Seeigelspermien fatal; sie würden den Sinn und Zweck ihres Daseins verfehlen – die Befruchtung der Eizelle.

Seeigel gehören zu den Stachelhäutern - Wirbellose, die in Gruppen von etwa 30 Tieren am Meeresboden leben. Sie sind externe Befruchter, d.h. sie entlassen ihre Keimzellen einfach ins Meerwasser. Dort beginnen die Spermien ihre Suche nach der Eizelle. Die Aufgabe scheint nahezu unlösbar. Ein Vergleich soll dies veranschaulichen: Ein Spermium ist ca. 0,05 mm lang; die Eizelle hat einen Durchmesser von ca. 0,15 mm. Nehmen wir einmal an, dass Eizelle und Spermium 1 cm voneinander entfernt seien. Auf die Dimensionen eines Menschen mit einer Größe von 180 cm übertragen würde die Aufgabe darin bestehen, eine Kugel mit einem Durchmesser von 5,4 m in einem Umkreis von 360 m zu finden – und zwar ohne

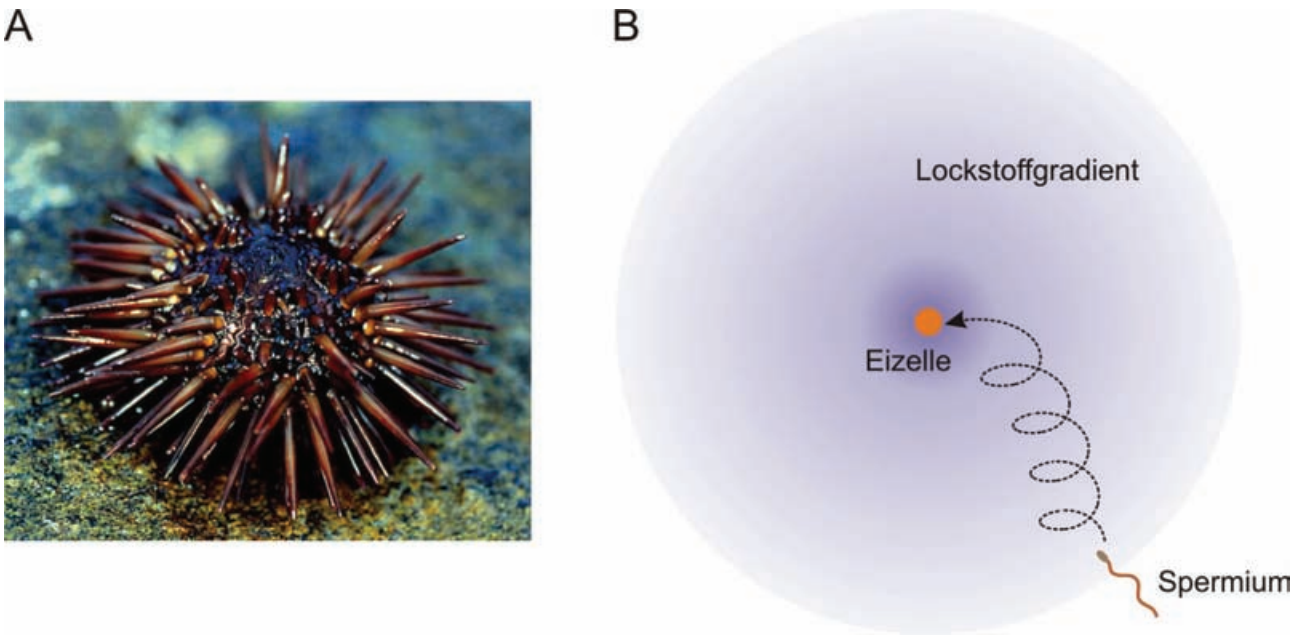


Abbildung 1: A. Seeigel der Art *Arbacia punctulata*. B. Eizelle mit Lockstoffgradient. Die Eizelle setzt den Lockstoff frei. Dieser bildet einen Gradienten um die Eizelle aus. Das Spermium nimmt den Lockstoff wahr und bewegt sich auf kreisförmigen Bahnen auf die Eizelle zu.

sehen zu können! Als wenn das nicht schon schwierig genug wäre, gibt es am Meeresboden nicht nur ca. 900 verschiedene Seeigelarten, sondern auch viele andere Tierarten wie z.B. Seeanemonen, Seesterne und Fische. Sie alle befruchten extern. Wie schafft es das Seeigelspermium in dieser Umgebung „seine" Eizelle zu finden?

Seeigel haben dazu zwei Strategien entwickelt: Zum einen schicken sie – frei nach dem Motto „Nicht kleckern, sondern klotzen!" – etwa 100 Milliarden Spermien (ein Mann bringt es im Vergleich dazu „nur" auf etwa 200 Millionen) und einige Millionen Eizellen ins Rennen. Zum anderen unterstützt die Eizelle die Suche ihrer männlichen Kollegen, indem sie für ihre Art spezifische Lockstoffe ausschüttet. Diese Lockstoffe bilden einen Gradienten um die Eizelle; d.h. je näher das Spermium der Eizelle kommt, desto mehr Lockstoffmoleküle weisen ihm den Weg. In der Biologie nennt man diese gerichtete Bewegung hin zur Quelle eines chemischen Lockstoffes *Chemotaxis* (Abbildung 1).

Für die Seeigelart *Arbacia punctulata* sind der Lockstoff und einige Schritte des chemotaktischen Signalwegs seit einigen Jahren bekannt. Den Lockstoff können wir sogar leicht künstlich herstellen. Das ermöglicht uns, „Eizelle zu spielen". Stimulieren wir Spermien in einer Versuchskammer mit dem Lockstoff, ändert sich ihr Schwimmverhalten; sie schwimmen auf kreisförmigen Bahnen auf die vermeintliche Eizelle zu. Unsere Abteilung konnte zeigen, dass die Spermien dabei äußerst empfindlich sind: Sie können die Bindung eines einzelnen Lockstoffmoleküls wahrnehmen und darauf reagieren [1]. Auf molekularer Ebene geschieht dabei Folgendes: Der Lockstoff bindet an einen spezifischen Rezeptor auf der Oberfläche des Spermienschwanzes (Flagellum), dem „Ruder" des Spermiums. Die Bindung bewirkt, dass ein wichtiger Botenstoff im Schwanz hergestellt wird: das zyklische Nukleotid cGMP. Doch welche „Botschaft" überbringt dieses zyklische Nukleotid? Und an wen? Empfänger der Nachricht „Achtung, Eizelle in der Nähe!" ist ein Ionenkanal. Durch cGMP wird dieser geöffnet und Kalium-Ionen, also positiv geladene Ionen, strömen aus dem Flagellum in die Umgebung, das Meerwasser. Dies führt dazu, dass die Spannung, die über der Zellmembran zwischen dem Inneren des Spermiums und der Umgebung anliegt, kurzfristig sehr viel negativer wird [2]: Dies ist das Zeichen für die folgenden Moleküle des Signalwegs, dass es jetzt losgeht!

Mir ist es gelungen, die DNA, die die Erbinformation für diesen Ionenkanal trägt, aus Hodengewebe von *A. punctulata* zu isolieren. Der Ionenkanal wurde von uns CNGK-Kanal (K^+-*selective cyclic nucleotide-gated channel*) genannt [3]. Aus der DNA lässt sich die Aminosäuresequenz ableiten, die bereits auf einige Kanaleigenschaften hinweist. Sie zeigt, dass der CNGK-Kanal zwar bekannte Strukturmotive anderer Ionenkanäle besitzt, trotzdem aber eine völlig neue Ionenkanalfamilie bildet. Durch seine Bindestelle für zyklische Nukleotide ähnelt der CNGK-Kanal am meisten den zyklisch Nukleotid-gesteuerten Ionenkanälen (CNG-Kanäle). CNG-Kanäle setzen sich aus vier einzelnen „Bausteinen", den Untereinheiten, zusammen. Jede Untereinheit besitzt sechs Segmente, die die Membran durchspannen, eine Porenregion und eine Bindestelle für zyklische Nukleotide. Die vier Untereinheiten lagern sich als Tetramer um eine zentrale Pore. Der CNGK-Kanal zeigt jedoch eine neue Struktur: Er besitzt vier ähnliche Kanaldomänen, die alle den gleichen prinzipiellen Aufbau wie eine CNG-Kanaluntereinheit aufweisen. Die vier Kanaldomänen sind jedoch wie in einer Kette miteinander verbunden und lagern sich

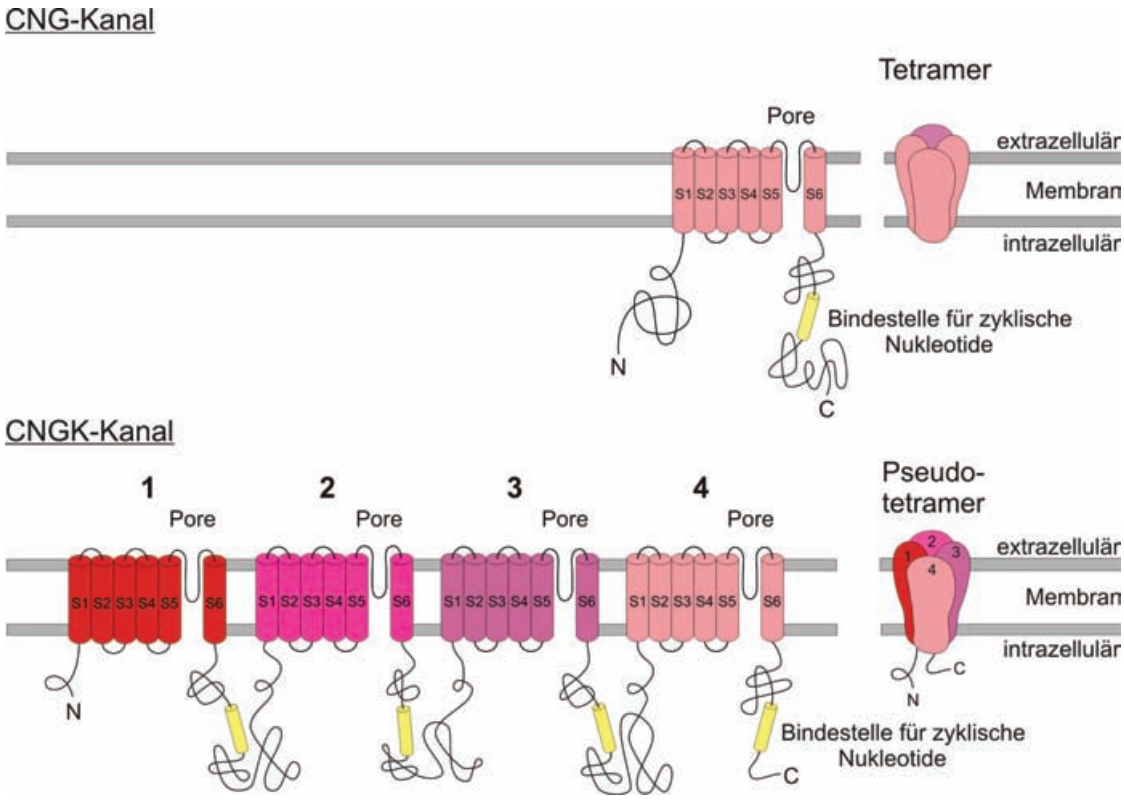


Abbildung 2: Vergleich von CNG- und CNGK-Kanälen. Die Abbildung vergleicht den Aufbau von CNG- und CNGK-Kanälen. Während sich bei CNG-Kanälen (oben) vier einzelne Untereinheiten zu einem Tetramer zusammenlagern, besitzt der CNGK-Kanal (unten) alle vier Kanaldomänen in einer sogenannten Polypeptidkette; die vier Kanaldomänen bilden ein Pseudotetramer aus. Mit S1-S6 sind die Segmente, die die Membran durchspannen, gekennzeichnet. Die Bindestelle für zyklische Nukleotide ist als gelbe Tonne dargestellt.

vermutlich zu einem sogenannten Pseudotetramer zusammen.

Aber nicht nur durch seine Architektur, sondern auch durch seine Ionenselektivität unterscheidet sich der CNGK-Kanal von den klassischen CNG-Kanälen. Betrachtet man den Aminosäurebereich, der die zentrale Pore meines Kanals bildet, so findet man dort eine charakteristische Abfolge von Aminosäuren, die man sehr gut von Kalium-Kanälen kennt: Es ist das Glyzin-Tyrosin-Glyzin-Asparaginsäure-Motiv, im Einbuchstabencode GYGD [4]. Der US-amerikanische Forscher Roderick MacKinnon (Rockefeller University, New York) hat lange und intensiv dieses Motiv untersucht. Seine Arbeiten zur Selektivität von Kalium-Kanälen wurden 2003 mit dem Nobelpreis belohnt. Tatsächlich finde ich das GYGD-Motiv in jeder der vier Kanaldomänen des CNGK-Kanals – ein deutlicher Hinweis darauf, dass der CNGK-Kanal Kalium-selektiv ist. Klassischen CNG-Kanälen aus Wirbeltieren fehlt das GYGD-Motiv; sie können zwischen verschiedenen positiv geladenen Ionen nicht unterscheiden und leiten sie gleichermaßen gut.

Mit Antikörpern, die spezifisch gegen den CNGK-Kanal gerichtet sind, konnte ich den Kanal im Schwanz nachweisen (Abbildung 3) – also genau dort, wo der chemotaktische Signalweg stattfindet. Um die elektrischen Eigenschaften zu

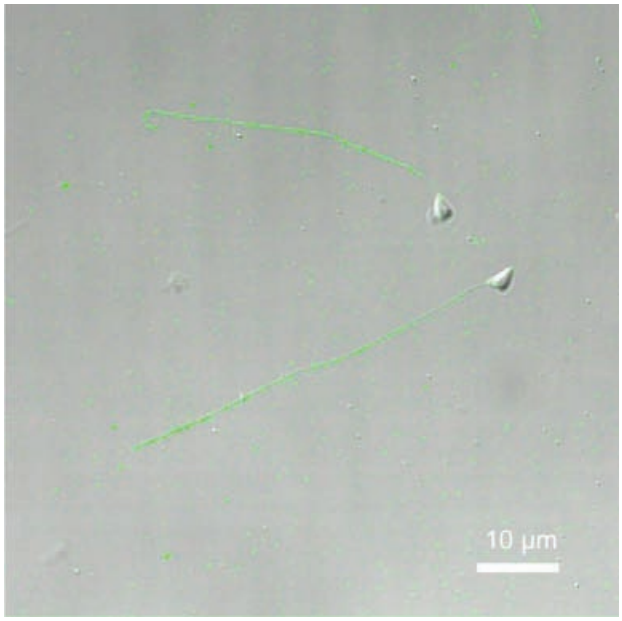


Abbildung 3: Der CNGK-Kanal ist im Flagellum von *A. punctulata*-Spermien lokalisiert. Durch einen spezifischen Antikörper kann der CNGK-Kanal in den Flagellen der Spermien sichtbar gemacht werden. Der weiße Balken in der Abbildung entspricht 10 Mikrometer – $10x10^{-6}$ Meter.

untersuchen, wurde der CNGK-Kanal in Wirtszellen hergestellt. Anschließend hat Dr. Reinhard Seifert (Abteilung Molekulare Neurosensorik) in diesen Zellen die Ionenströme durch den CNGK-Kanal mit Mikroelektroden gemessen. Diese Messungen zeigen, dass der CNGK-Kanal durch die Bindung von cGMP geöffnet wird und tatsächlich selektiv für Kalium-Ionen ist.

Eine spannende Frage war, wie viel cGMP notwendig ist, um den CNGK-Kanal zu öffnen. Dazu wurden die Ionenströme durch den Kanal bei unterschiedlichen cGMP-Konzentrationen miteinander verglichen. Stellt man dies grafisch dar, erhält man eine sogenannte Dosis-Wirkungskurve. Daraus lässt sich die Konzentration berechnen, bei der der Strom und damit die Aktivierung des Kanals halbmaximal sind. Es war überraschend, wie empfindlich der CNGK-Kanal für cGMP ist: Schon bei Konzentrationen von 25 Nanomol (ein Milliardstel Mol) pro Liter sind die Hälfte der CNGK-Kanäle aktiviert. Vergleicht man die Dosis-Wirkungskurve des CNGK-Kanals mit der von klassischen CNG-Kanälen, so fallen zwei wesentliche Unterschiede auf: Zum einen ist der CNGK-Kanal ca. 100-1000fach empfindlicher für cGMP als klassische CNG-Kanäle; zum anderen ist die Kurve weniger steil. Aus der Steigung dieser Kurve kann man einiges über den Aktivierungsmechanismus der Kanäle erfahren. So ist für die klassischen CNG-Kanäle aus dieser Steigung richtig vorhergesagt worden, dass mindestens zwei cGMP-Moleküle an den Kanal binden müssen, um ihn zu öffnen. Man bezeichnet den Aktivierungsmechanismus der CNG-Kanäle als kooperativ, d.h. die cGMP-Moleküle unterstützen sich gegenseitig bei der Öffnung des Kanals. Die Aktivierung des CNGK-Kanals hingegen erfolgt nicht-kooperativ. Anders ausgedrückt: Nur ein cGMP-Molekül ist vermutlich notwendig, um den CNGK-Kanal zu öffnen.

Das wollte ich nun genauer wissen. Ich habe ganz gezielt Mutationen in den CNGK-Kanal eingefügt, durch die einzelne oder mehrere der vier Bindestellen so verändert wurden, dass cGMP praktisch nicht mehr an diese binden kann. Durch die Kombination sämtlicher Mutationen konnte ich unsere Vermutung bestätigen, dass ein cGMP-Molekül ausreicht, um den Kanal zu öffnen. Die Versuche haben sogar noch mehr gezeigt: Für die Aktivierung des Kanals ist allein die Bindestelle in der dritten Kanaldomäne verantwortlich.

Für das Spermium sind diese Kanaleigenschaften von großer Bedeutung: Das Volumen des Schwanzes ist mit 1,6 Femtolitern (1,6 Billiardstel Liter) äußerst gering. Ein einziges cGMP-Molekül im Schwanz entspricht einer Konzentration von einem Nanomol pro Liter. Da der CNGK-Kanal bereits durch 25

Nanomol pro Liter aktiviert wird, werden also nur wenige Moleküle cGMP benötigt, um den Kanal zu öffnen. Wir haben abgeschätzt, dass bei der Stimulation eines Spermiums mit einem einzelnen Lockstoffmolekül 40-50 cGMP-Moleküle gebildet werden [3] – in einer Welt, in der es von Molekülen nur so wimmelt, eine sehr geringe Zahl! Wie viele dieser Moleküle tatsächlich die CNGK-Kanäle aktivieren, wissen wir noch nicht. Sicher ist aber, dass erst der CNGK-Kanal es dem Spermium ermöglicht, so hoch „sensibel" zu reagieren.

Manchmal kann es eben doch sinnvoll sein, wenn man(n) auf Frau „hört"!

Referenzen

[1] Kaupp, U.B., Solzin, J., Hildebrand, E., Brown, J.E., Helbig, A., Hagen, V., Beyermann, M., Pampaloni, F., and Weyand, I. (2003) "The signal flow and motor response controling chemotaxis of sea urchin sperm" *Nat. Cell. Biol.* 5 (2), 109

[2] Strünker, T., Weyand, I., Bönigk, W., Van, Q., Loogen, A., Brown, J.E., Kashikar, N., Hagen, V., Krause, E., and Kaupp, U.B. (2006) "A K^+ selective cGMP-gated ion channel controls chemosensation of sperm" *Nat. Cell. Biol.* 8 (10), 1149

[3] Bönigk, W., Loogen, A., Seifert, R., Kashikar, N., Klemm, C., Krause, E., Hagen, V., Kremmer, E., Strünker, T., and Kaupp, U.B. (2009) "The native rat olfactory cyclic nucleotide-gated channel is composed of three distinct subunits" *Sci. Signal.* 2 (94), ra68

[4] Heginbotham, L. and MacKinnon, R. (1992) "The aromatic binding site for tetraethylammonium ion on potassium channels" *Neuron* 8 (3), 483

Astrid Müller (geb. Loogen) hat Biologie an der Universität zu Köln studiert. Für ihre Arbeit zur Klonierung und Charakterisierung eines K^+-selektiven zyklisch Nukleotid-gesteuerten Ionenkanals aus Seeigel-spermien bei Herrn Prof. U.B. Kaupp am Forschungszentrum Jülich hat sie im Juni 2006 ihr Diplom erhalten. Die Arbeit an diesem Projekt hat sie in ihrer Doktorarbeit zunächst im Forschungszentrum Jülich und ab Mai 2008 bei caesar fortgesetzt. Zusammen mit Dr. Reinhard Seifert hat sie im Juni 2008 auf der Gordon Research Conference of Ion Channels in Tilton, NH, USA den Posterpreis für diese Arbeit verliehen bekommen. Im Juni 2009 hat sie ihren Doktortitel erhalten. Seit Juli 2009 ist sie als wissenschaftliche Mitarbeiterin, seit Februar 2010 als Gastwissenschaftlerin im Forschungszentrum caesar tätig.

Publikationen 2009

Bönigk, W., Loogen, A., Seifert, R., Kashikar, N.D., Klemm, C., Krause, E., Hagen, V., Kremmer, E., Strünker, T., and Kaupp, U.B. (2009) “An atypical CNG channel activated by a single cGMP molecule controls sperm chemotaxis“ *Sci. Signal.* 2, ra68

Bulic, B., Pickhardt, M., Schmidt, B., Mandelkow, E.M., Waldmann, H., and Mandelkow, E. (2009) “Development of Tau aggregation inhibitors for Alzheimer‘s disease“ *Angew. Chem.* Int. Ed. 48, 1740-1752

Bulic, B. (2009) “Trapoxin B: from total synthesis to epigenetics“ In: *Chemical Biology* (Weinheim: Wiley-VCH), 135-144

Ctistis, G., Papaioannou, E., Patoka, P., Gutek, J., Fumagalli, P., and Giersig, M. (2009) “Optical and magnetic properties of hexagonal arrays of subwavelength holes in optically thin cobalt films“ *Nano Lett.* 9, 1-6

Eckstein, N., Servan, K., Hildebrandt, B., Pölitz, A., von Jonquieres, G., Wolf-Kümmeth, S., Napierski, I., Hamacher, A., Kassack, M.U., Budczies, J., Beier, M., Dietel, M., Royer-Pokora, B., Denkert, C., and Royer, H.D. (2009) “Hyperactivation of the insulin-like growth factor receptor I signaling pathway is an essential event for cisplatin resistance of ovarian cancer cells” *Cancer Res.* 69, 2996-3003

Egler, C., Albert, T., Brokemper, O., Zabe-Kühn, M., Mayer, A., Oldenburg, J., and Schwaab, R. (2009) “Kinetic parameters of monoclonal antibodies ESH2, ESH4, ESH5, and ESH8 on coagulation factor VIII and their influence on factor VIII activity” *J. Mol. Recognit.* 22, 301-306

Eisele, T., Hausmann, R., Gregor, I., Enderlein, J., and Schmalzing, G. (2009) “Subunit stoichiometry of heterologously expressed P2X receptors analyzed by single-molecule spectroscopy” *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 379, Suppl. 1, 15

Fleissner, M.R., Brustad, E.M., Altenbach, C., Cascio, D., Peters, F.B., Hideg, K., Peuker, S., Schultz, P.G., and Hubbell, W.L. (2009) “Site-directed spin labeling of a genetically encoded unnatural amino acid” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 21637-21642

Gluz, O., Mengele, K., Schmitt, M., Kates, R., Diallo-Danebrock, R., Neff, F., Royer, H.D., Eckstein, N., Mohrmann, S., Ting, E., Kiechle, M., Poremba, C., Nitz, U., and Harbeck, N. (2009) “Y-box-binding protein YB-1 identifies high-risk patients with primary breast cancer benefiting from rapidly cycled tandem high-dose adjuvant chemotherapy“ *J. Clin. Oncol.* 27, 6144-6151

Gluz, O., Mengele, K., Schmitt, M., Kates, R., Diallo-Danebrock, R., Royer, H.D., Eckstein, N., Mohrmann, S., Nitz, U., and Harbeck, N. (2009) "Y-box binding protein YB-1 identifies high-risk primary breast cancer patients benefiting from rapidly cycled tandem high-dose adjuvant chemotherapy" *Ann. Oncol.* 20, Suppl. 2, ii55

Griesshaber, E., Kelm, K., Sehrbrock, A., Mader, W., Mutterlose, J., Brand, U., and Schmahl, W.W. (2009) "Amorphous calcium carbonate in the shell material of the brachiopod Megerlia truncata" *Eur. J. Mineral.* 21, 715-723

Gronewold, T.M.A., Baumgartner, A., Hierer, J., Sierra, S., Blind, M., Schäfer, F., Blümer, J., Tillmann, T., Kiwitz, A., Kaiser, R., Zabe-Kühn, M., Quandt, E., and Famulok, M. (2009) "Kinetic binding analysis of aptamers targeting HIV-1 proteins by a combination of a Microbalance Array and Mass Spectrometry (MAMS)" *J. Proteome Res.* 8, 3568-3577

Gronewold, T.M.A., Baumgartner, A., Weckmann, A., Knekties, J., and Egler, C. (2009) "Selection process generating peptide aptamers and analysis of their binding to the TiO_2 surface of a surface acoustic wave sensor" *Acta Biomater.* 5, 794-800

Gwinner, M.C., Koroknay, E., Fu, L.W., Patoka, P., Kandulski, W., Giersig, M., and Giessen, H. (2009) "Periodic large-area metallic split-ring resonator metamaterial fabrication based on shadow nanosphere litography" *Small* 5, 400-406

Harzheim, D., Roderick, H.L., and Bootman, M.D. (2009) "Intracellular Calcium Signaling" In: Ralph, A.B., and Edward, A.D. (eds.): *Handbook of Cell Signaling* (2nd ed.) (San Diego: Academic Press), 937-942

Harzheim, D., Movassagh, M., Foo, R.S.Y., Ritter, O., Tashfeen, A., Conway, S.J., Bootman, M.D., and Roderick, H.L. (2009) "Increased $InsP_3Rs$ in the junctional sarcoplasmic reticulum augment Ca^{2+} transients and arrhythmias associated with cardiac hypertrophy" *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 11406-11411

Irsen, S., Lütke Notarp, D., Kuehnlein, H.H., and Verbunt, H. (2009) "Accelerated ageing tests of solar cells - An In Situ transmission of electron microscopy study" *Imaging and Microscopy* 11, 42-43

Kashikar, N.D. (2009) "Sensitivity regulation in sperm during chemotaxis", Dissertation: Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität zu Köln

Katranidis, A., Atta, D., Schlesinger, R., Nierhaus, K.H., Choli-Papadopoulou, T., Gregor, I., Gerrits, M., Büldt, G., and Fitter, J. (2009) "Fast biosynthesis of GFP molecules: A single-molecule fluorescence study" *Angew. Chem. Int. Ed.* 48, 1758-1761

Kelm, K., Aguilar, J., Drevermann, A., Schmitz, G.J., Palm, M., Stein, F., Engberding, N., and Irsen, S. (2009) “In situ TEM observation of precipitation reactions in $Ti_{40}Al_{60}$ and $Ti_{38}Al_{62}$ alloys and symmetry relations of the phases involved” Mater. Res. Soc. Symp. Proc. 1128, No. U04-02, 135-140

Kilic, F., Kashikar, N.D., Schmidt, R., Alvarez, L., Dai, L., Weyand, I., Wiesner, B., Goodwin, N., Hagen, V., and Kaupp, U.B. (2009) “Caged progesterone: a new tool for studying rapid nongenomic actions of progesterone“ *J. Am. Chem. Soc*. 131, 4027-4030

Klenzner, T., Knapp, F.B., Schipper, J., Raczkowsky, J., Woern, H., Kahrs, L.A., Werner, M., and Hering, P. (2009) “High precision cochleostomy by use of a pulsed CO_2 laser - an experimental approach” *Cochlear Implants Int.* 10, 58-62

Krähling, M. (2009) „Charakterisierung eines neuen hodenspezifischen Proteins mit einer Bindestelle für cAMP/cGMP”, Dissertation: Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität zu Köln

Lenz, J., Wilhein, T., and Irsen, S. (2009) “Nanofabrication of diffractive elements for soft x-ray and extreme ultraviolet applications using ion beam lithography“ *Appl. Phys. Lett.* 95, 191118

Loogen, A. (2009) „Klonierung und Charakterisierung eines ungewöhnlichen K^+-selektiven zyklisch Nukleotid-gesteuerten Ionenkanals aus Seeigelspermien“, Dissertation: Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität zu Köln

Mardare, C.C., Spiegel, M., Savan, A., and Ludwig, A. (2009) “Thermally oxidized Mn-Co thin films as protective coatings for SOFC interconnects“ *J Electrochem Soc* 156, B1431-1439

Merkle, A.P., Pokrant, S., and Irsen, S. (2009) “Low-loss energy-filtered transmission electron microscopy for imaging and analysis of nanoparticles” *Microsc. Microanal. 15,* Suppl. 2, 490-491

Ritter, L., Mischkowski, R.A., Neugebauer, J., Dreiseidler, T., Scheer, M., Keeve, E., and Zöller, J.E. (2009) “The influence of body mass index, age, implants, and dental restorations on image quality of cone beam computed tomography” *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 108, E108-116

Rosenkranz, T., Katranidis, A., Atta, D., Gregor, I., Enderlein, J., Grzelakowski, M., Rigler, P., Meier, W., and Fitter, J. (2009) “Observing proteins as single molecules encapsulated in surface-tethered polymeric nanocontainers” *ChemBiochem* 10, 702-709

Schmitz, H., Bousack, H., Schmitz, S., and Lacher, M. (2009) “The infrared sensilla in the beetle Melanophila acuminata as model for new fire sensors” Proceedings of the 14th International Conference on Automatic Fire Detection (AUBE 09), Universität Duisburg-Essen (8. -10. 09. 2009) 2, 189-198

Schönebeck, B., Hartschen, H.J., Schindel, M., Degistirici, Ö., Siemonsmeier, J., Goetz, W., and Thie, M. (2009) "Molecular characterization of human impacted third molars: diversification of compartments" *Cells Tissues Organs* 189, 356-370

Schünke, S., Stoldt, M., Novak, K., Kaupp, U.B., and Willbold, D. (2009) "Solution structure of the Mesorhizobium loti K1 channel cyclic nucleotide-binding domain in complex with cAMP" *EMBO Rep.* 10, 729-735

Seitz, H., Deisinger, U., Leukers, B., Detsch, R., and Ziegler, G. (2009) "Different calcium phosphate granules for 3D printing of bone tissue engineering scaffolds" *Adv. Eng. Mater.* 11, B41-46

Strunk, J.J., Gregor, I., Becker, Y., Lamken, P., Lata, S., Reichel, A., Enderlein, J., and Piehler, J. (2009) "Probing protein conformations by in situ non-covalent fluorescence labeling" *Bioconjug. Chem.* 20, 41-46

Sturm, D., Heilmaier, M., Saage, H., Paninski, M., Schmitz, G.J., Drevermann, A., Palm, M., Stein, F., Engberding, N., Kelm, K., and Irsen, S. (2009) "Creep strength of centrifugally cast Al-rich TiAl alloys" *Mater. Sci Eng.* A 510-511, 373-376

Thelen, A., Frey, S., Hirsch, S., and Hering, P. (2009) "Improvements in shape-from-focus for holographic reconstructions with regard to focus operators, neighborhood-size, and height value interpolation" *IEEE Trans. Image Process.* 18, 151-157

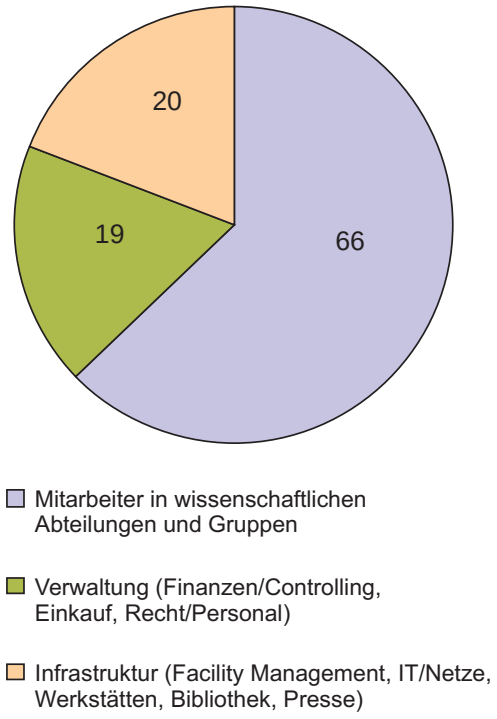
Tille, C., Bens, A.T., and Seitz, H. (2009) "Processing and mechanical properties of a new flexible acrylic stereolithographic resin family for engineering and medical device manufacturing" *International Journal of Computer Applications in Technology (IJCAT)* 36, 10-15

Vitushinsky, R., Schmitz, S., and Ludwig, A. (2009) "Bistable thin-film shape memory actuators for applications in tactile displays" *J. Microelectromech. Syst*. 18, 186-194

Personal / Finanzen 2009

Mitarbeiterstruktur

Bei der Stiftung caesar waren zum 01.01.2010 insgesamt 105 Personen beschäftigt.



Personalentwicklung

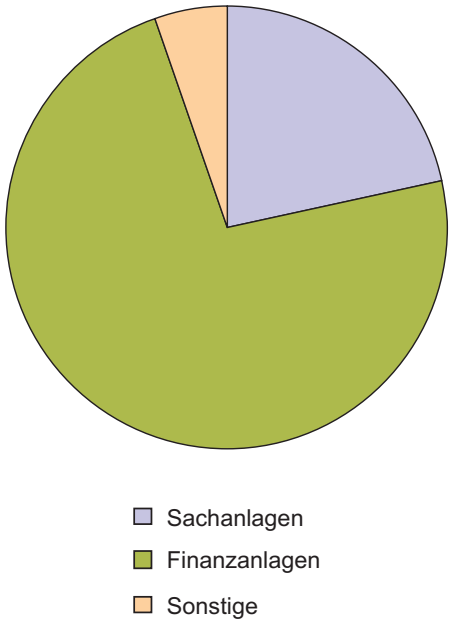
In den Jahren 2009 und 2010 hat sich der Personalbestand entsprechend den wissenschaftlichen Aufgaben stabilisiert. Zusätzlich nutzt caesar auch die Möglichkeit, Forschung in Kooperationsprojekten zu betreiben, für die kein eigenes Personal eingestellt werden muss. Besonders wichtig sind in diesem Zusammenhang die Kooperationen mit der Universität Bonn und dem Deutschen Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen (DZNE).

Grundstock 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 Erstausstattung des Forschungszentrums finanziert. Die Stiftung hat 286,3 Mio € des Stiftungskapitals langfristig am Kapitalmarkt angelegt. Mit den Erträgen wird die Forschung finanziert.

Vermögen

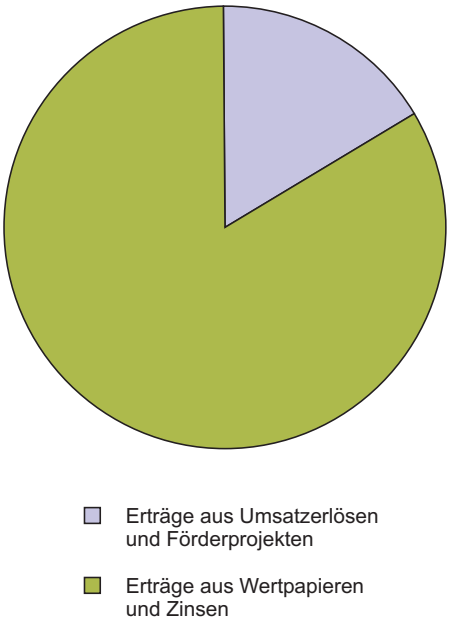
Das Vermögen im Jahr 2009 setzt sich wie folgt zusammen:



Sachanlagen	86.443.152 €
Finanzanlagen	290.197.956 €
Sonstige	20.598.326 €
Bilanzsumme	**397.239.434 €**

Erträge

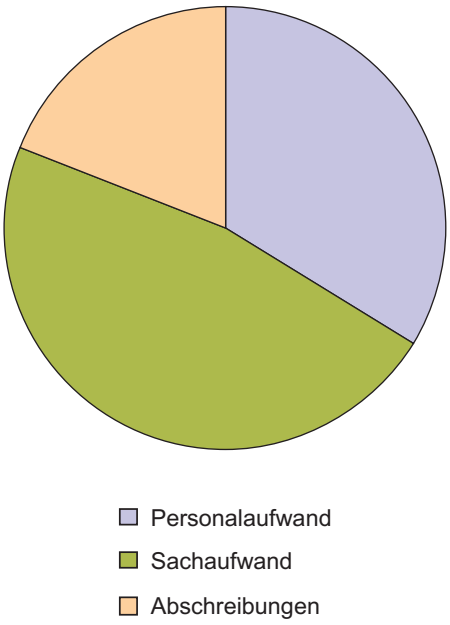
Die Erträge im Jahr 2009 verteilen sich wie folgt:



Erträge aus Umsatzerlösen und Förderprojekten	2.239.438 €
Erträge aus Wertpapieren und Zinsen	11.301.031 €
Erträge insgesamt	**13.540.469 €**

Aufwendungen

Für 2009 ergeben sich die folgenden Aufwendungen:



Personalaufwand	4.641.488 €
Sachaufwand	6.402.158 €
Abschreibungen	2.601.911 €
Aufwendungen insgesamt	**13.645.557 €**

Jahresbilanz 2009

Bilanzabschluss zum 31. Dezember 2009 (Angaben in €)

Aktiva	31.12.2009	31.12.2008
A. Anlagevermögen		
I. Immaterielle Vermögensgegenstände	76.055	80.390
II. Sachanlagen		
Grundstücke & Bauten *)	71.541.448	71.464.250
Andere Anlagen	14.752.286	17.518.644
Geleistete Anzahlungen & Anlagen im Bau	73.363	66.924
Summe aus II.	86.367.097	89.049.818
III. Finanzanlagen		
Beteiligungen	220.942	227.142
Wertpapiere des Anlagevermögens zur Anlage des Stiftungsvermögen	287.698.307	287.698.307
Wertpapiere des Anlagevermögens zur Gebäudewiederbeschaffung	2.278.707	1.528.777
Summe aus III.	290.197.956	289.454.226
Summe für A.	**376.641.108**	**378.584.434**
B. Umlaufvermögen		
I. Vorräte	259.729	226.495
II. Forderungen und sonstige Vermögensgegenstände		
Forderungen aus Lieferungen und Leistungen	184.225	192.429
Forderungen gegen Unternehmen, mit denen ein Beteiligungsverhältnis besteht	658.819	518.965
Sonstige Vermögensgegenstände	1.048.263	1.854.388
Summe aus II.	1.891.307	2.565.782
III. Wertpapiere	11.055.442	10.221.300
IV. Kassenbestand, Bundesbankguthaben, Guthaben bei Kreditinstituten und Schecks	7.179.812	4.973.381
Summe für B.	**20.386.290**	**17.986.958**
C. Rechnungabgrenzungsposten	**212.063**	**226.675**
Gesamtes Vermögen	**397.239.434**	**396.798.067**

*) § 253 Abs. 2 HGB wird nicht angewendet. Stattdessen werden Rücklagen gebildet.

Passiva	31.12.2009	31.12.2008
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	2.772.186	1.654.060
III. Ergebnis		
Jahresüberschuss/- Fehlbetrag	-105.088	1.118.127
Summe für A.	**394.101.016**	**394.206.105**
B. Rückstellungen		
Instandhaltungsrücklage *)	1.943.800	1.443.800
Sonstige Rückstellungen	154.594	136.254
Summe für B.	**2.098.394**	**1.580.054**
C. Verbindlichkeiten		
Verbindlichkeiten aus Lieferungen und Leistungen	598.438	495.754
Sonstige Verbindlichkeiten	395.187	512.852
Summe für C.	**993.625**	**1.008.606**
D. Rechnungabgrenzungsposten	**46.399**	**3.302**
Gesamtes Vermögen	**397.239.434**	**396.798.067**

*) § 253 Abs. 2 HGB wird nicht angewendet. Stattdessen werden Rücklagen gebildet.

Organe der Stiftung

Stiftungsrat

Zum 31.12.2009 war der Stiftungsrat wie folgt zusammengesetzt:

Vorsitzender

Prof. Dr. Peter Gruss
Präsident der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V.

Mitglieder

Prof. Dr. Dr. Andreas Barner
Boehringer Ingelheim GmbH

Prof. Dr. Jürgen Fohrmann
Rektor der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

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

Prof. Dr. Florian Holsboer
Max-Planck-Institut für Psychiatrie

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

Prof. Dr. Herbert Jäckle
Vizepräsident der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. ,
Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie

Jürgen Nimptsch
Oberbürgermeister der Bundesstadt Bonn

Dr. Stephan Eisel
Mitglied des Deutschen Bundestages

Ulrich Schüller
Leiter der Abteilung 4 im Bundesministerium für Bildung und Forschung

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

Helmut Stahl
Mitglied des Landtages NRW

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

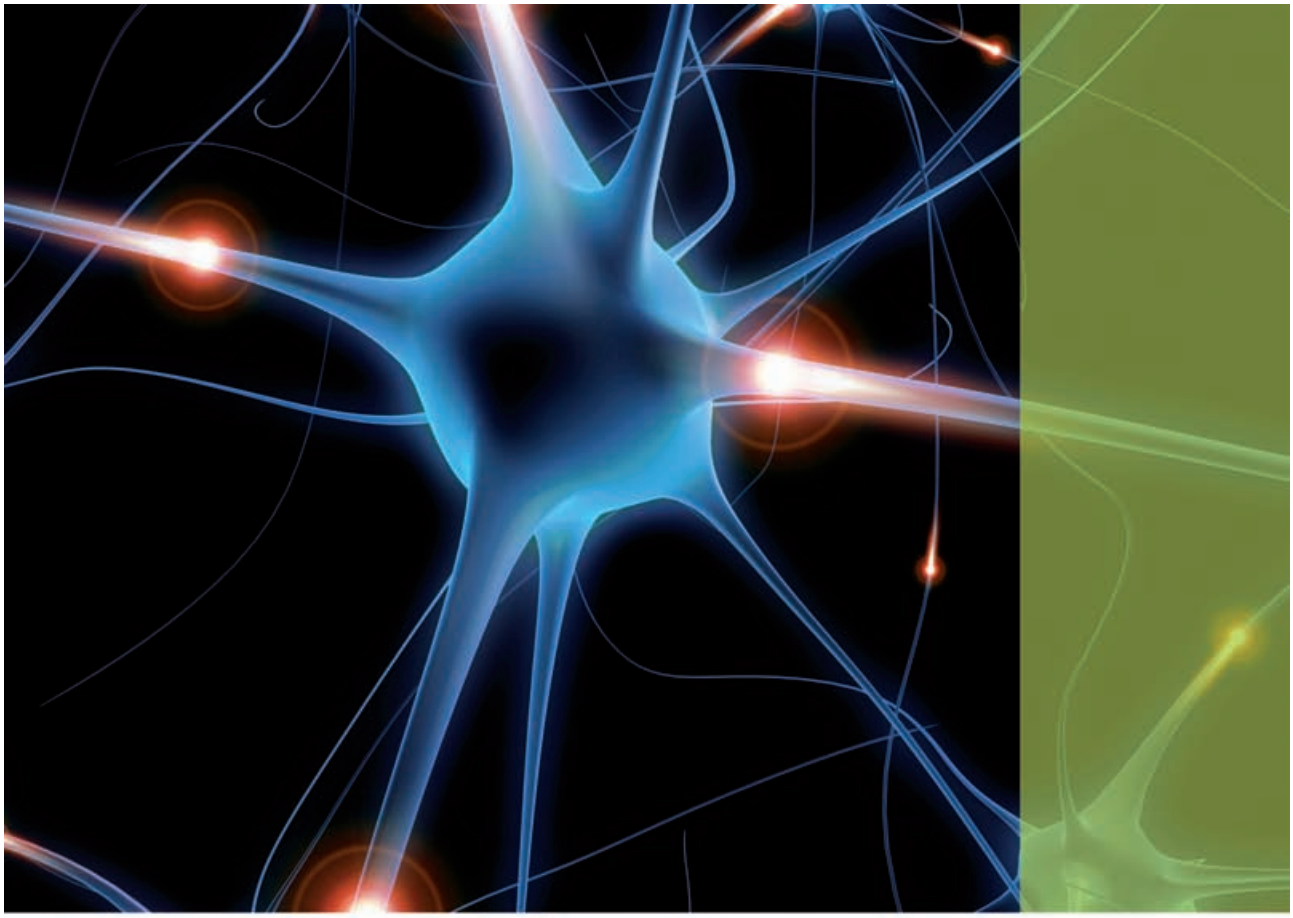
Dr. Michael Stückradt
Staatssekretär im Ministerium für Innovation, Wissenschaft, Forschung und Technologie des Landes NRW

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

Vorstand

Zum 31.12.2009 war der Vorstand wie folgt zusammengesetzt:

Prof. Dr. Ulrich Benjamin Kaupp, Wissenschaftlicher Direktor
Gertrud Bilski, Kaufmännische Geschäftsführerin



caesarium

Forschungszentrum caesar, Hörsaal
Donnerstag, 26.02.2009, 19 h

„Faszination Vogelzug - ein Phänomen der Superlative“

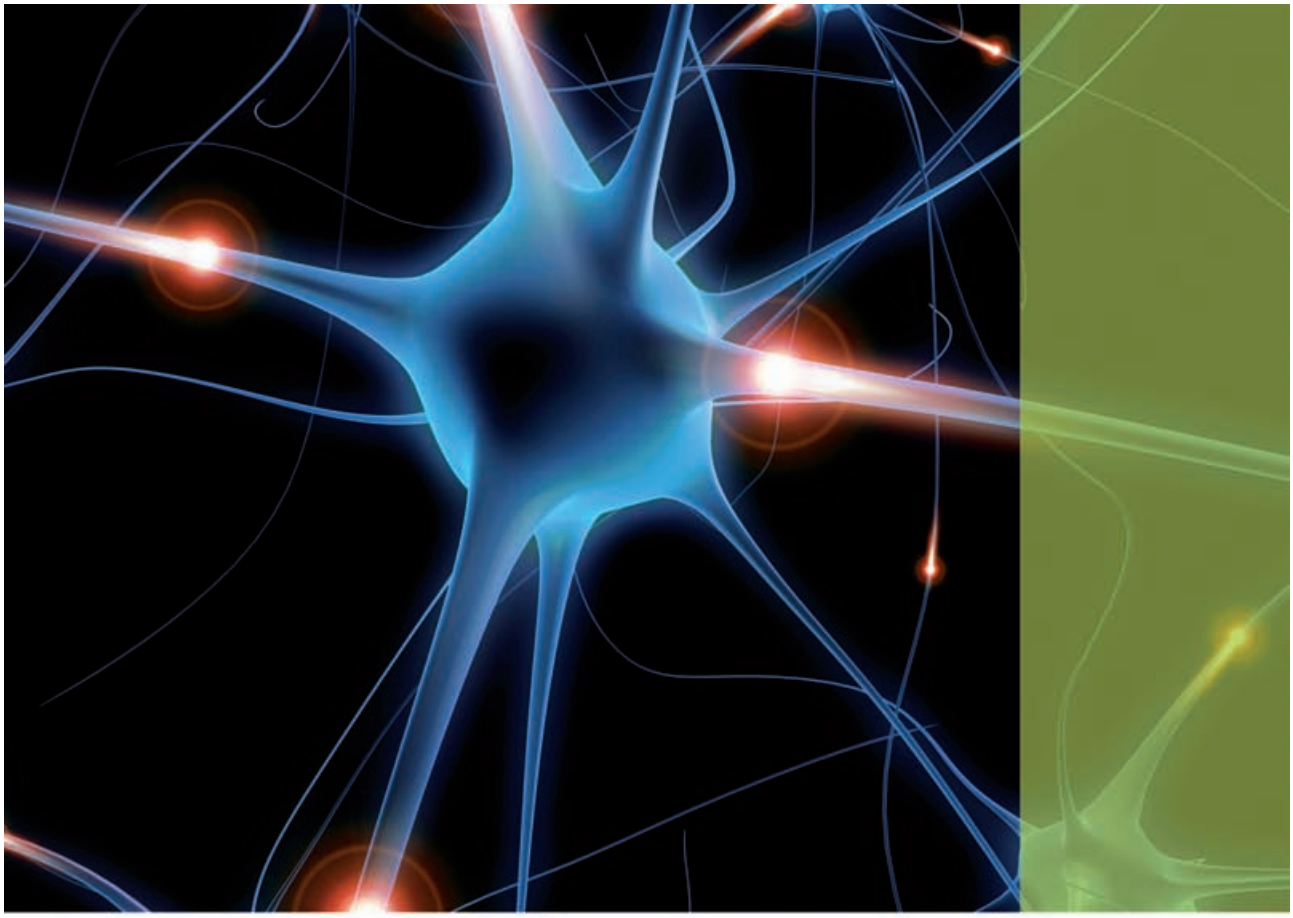
Prof. Dr. Peter Berthold
Max-Planck-Institut für Ornithologie,
Vogelwarte Radolfzell

caesar
center of advanced
europaen 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, 18.06.2009, 19 h

„Fading Memories - Ageing and Neurodegeneration“

Prof. Pierluigi Nicotera, M.D., Ph.D.
Deutsches Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen (DZNE), Bonn

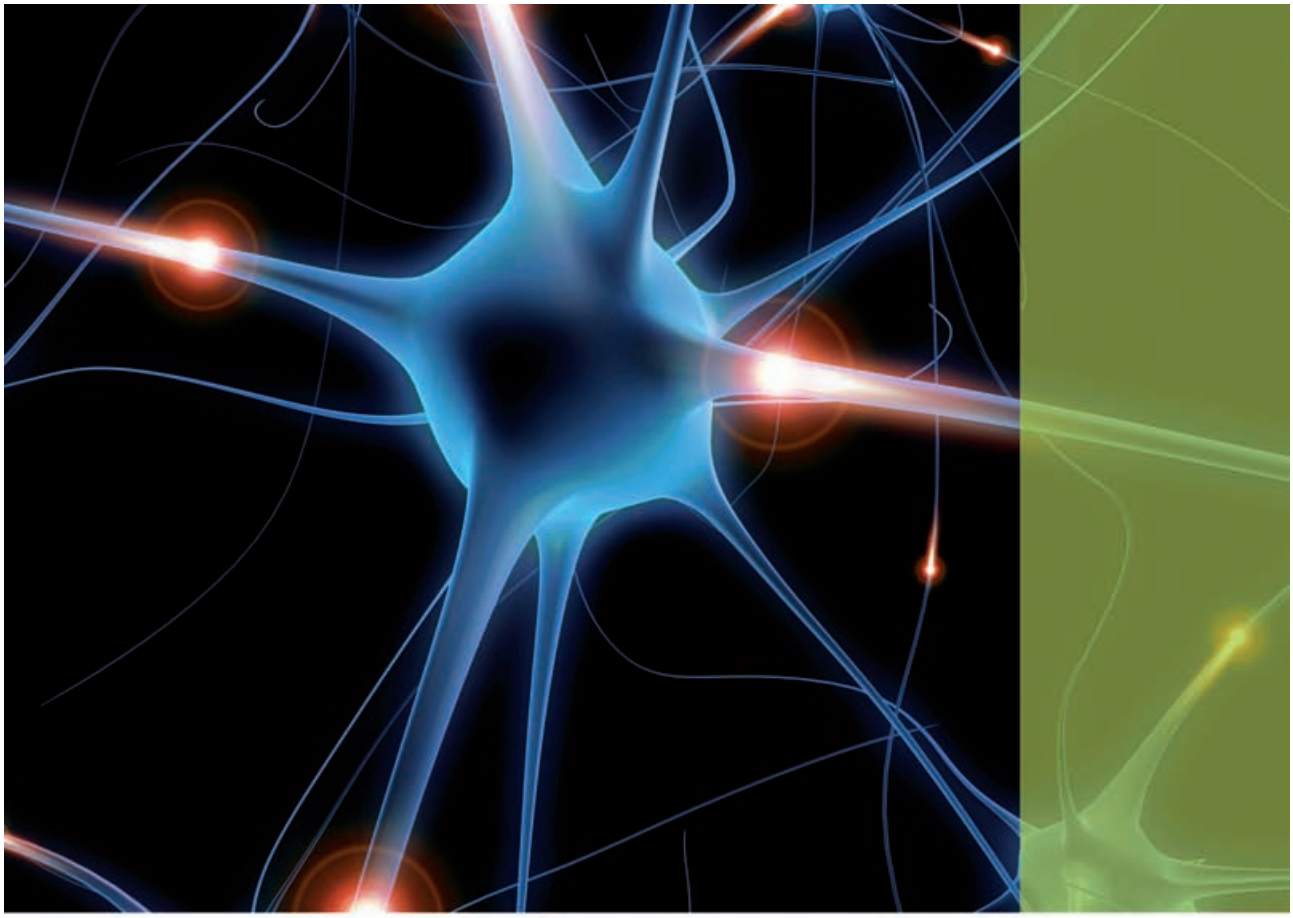
Vortrag in englischer Sprache

caesar
center of advanced europaen 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, 12.11.2009, 19 h

„Personalisierte Medizin -
Die große Herausforderung der Therapieforschung“

Prof. Dr. Dr. Dr. h.c. Florian Holsboer
Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München

caesar
center of advanced
europaen 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, 17.12.2009, 19 h

„Fairness und Motivation - eine neuroökonomische Perspektive“

Prof. Dr. Armin Falk
Abteilung für empirische Wirtschaftsforschung
Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

caesar
center of advanced europaen studies and research

www.caesar.de

Forschungszentrum caesar
Ludwig-Erhard-Allee 2
53175 Bonn

Stiftung caesar -
assoziiert mit der
Max-Planck-Gesellschaft

Impressum

Herausgeber	Stiftung caesar Ludwig-Erhard-Allee 2 D-53175 Bonn
Redaktion und Konzept	Prof. Dr. U. Benjamin Kaupp Dr. Jürgen Reifarth Stefan Hartmann
Textlayout	Diana Sigl
Graphikbearbeitung	Dr. Corinna Bernsdorff
Cover	Dr. René Pascal
Druck	Druckerei Brandt Rathausgasse 13 53111 Bonn

© 2010	Stiftung caesar Ludwig-Erhard-Allee 2 D-53175 Bonn Tel.: +49 (0)228 9656 - 0 Fax: +49 (0)229 9656 - 111 E-mail: office@caesar.de http://www.caesar.de