

Jahresbericht 2010

caesar



center of advanced
european studies
and research



Stiftung caesar -
assoziiert mit der
Max-Planck-Gesellschaft

caesar



center of advanced
european studies
and research



Inhaltsverzeichnis

Vorwort	7
Forschungsberichte	
Timo Strünker, Normann Goodwin und Christoph Brenker Aktenzeichen XY gelöst: Die Progesteronwirkung auf menschliche Spermien	11
Genelle Weule, ABC Science Online Sperm's egg-seeking secrets revealed	17
Andreas Fischer, Welt am Sonntag Der Lockruf der Eizelle	19
Stephan Irsen, Monika Fritz und Ashraf Al-Amoudi Das <i>Titan KRIOS</i> - Ein neues Werkzeug für die Kryo-Elektronenmikroskopie	21
Manfred Lacher und Siegfried Steltenkamp Neues aus der Mikrobionik: Strömungssensoren der Fische helfen Trinkwasser zu sparen	29
Berichte über abgeschlossene Doktorarbeiten	
Sebastian Peuker Wie Proteinstrukturen das Laufen lernen	39
Friederike Winkhaus Vom Monomer zum Tetramer - Gemeinsam sind wir stärker	45
Publikationen	52
Personal	54
Finanzen	56
Organe der Stiftung	60
caesarium	62

caesar



center of advanced
european studies
and research

Vorwort

Wer einen hohen Anspruch hat, muss sich messen lassen. Nach diesem Grundsatz werden alle Max-Planck-Institute regelmäßig alle zwei Jahre von einem externen Gutachtergremium, dem Fachbeirat, evaluiert und beraten. caesar hat sich 2010 zum ersten Mal dieser Begutachtung gestellt. Damit hat sich das assoziierte Institut weiter in den wissenschaftlichen Verbund der Max-Planck-Gesellschaft integriert.

International herausragende und unabhängige Wissenschaftler aus den USA und Israel haben den Aufbauprozess und die Forschungsergebnisse von caesar einer kritischen Prüfung unterzogen – mit äußerst positivem Ergebnis: Der Fachbeirat hat die aktuelle Arbeit von caesar als exzellent eingestuft und dem Institut ein enormes Potenzial bestätigt. Eine solche Einschätzung, nur zweieinhalb Jahre nachdem die wissenschaftliche Arbeit neu ausgerichtet wurde, beweist: caesar ist auf einem sehr guten Weg.

Zusätzlich hat sich caesar 2010 auch noch der erweiterten Evaluierung unterzogen. Bei dieser Form der Begutachtung vergleicht ein Beirat mehrere Institute. caesar ist in ein Forschungsfeld der biologisch-medizinischen Sektion der Max-Planck-Gesellschaft einbezogen und vor dem Hintergrund der internationalen Entwicklung und im Vergleich mit sechs Max-Planck-Instituten beurteilt worden. Gerade für die weitere Aufbauphase von caesar, insbesondere für die Suche nach weiteren

wissenschaftlichen Direktoren, konnte der Beirat wichtige Hinweise geben.

Die schon jetzt ausgezeichnete Arbeit von caesar schlägt sich inzwischen auch in wichtigen Publikationen nieder. So konnte eine Gruppe aus der Abteilung Molekulare Neurosensorik im März 2011 in der renommierten Zeitschrift Nature ein wichtiges Ergebnis veröffentlichen. Die Gruppe hatte entdeckt, dass das weibliche Sexualhormon Progesteron Ionenkanäle aktiviert, die sogenannten CatSper-Kanäle, und so das Schwimmverhalten von Spermien steuert. Damit konnte sie die Jahrzehnte alte Frage beantworten, wie Progesteron Kalzium-Signale in Spermien auslöst. Die Autoren schafften es mit dieser neuen Erkenntnis sogar bis auf den Titel von Nature.

Solche Forschungsergebnisse sind aber nicht nur wissenschaftlich interessant, sie können auch medizinisch bedeutsam werden: Wenn es gelingt, die nun erkannte Wechselwirkung zwischen Progesteron und dem Ionenkanal spezifisch zu stören, kann man in Zukunft neue, noch besser verträgliche Verhütungsmittel entwickeln.

Darüber hinaus zeigen die Forschungsarbeiten auch, wie eng die Arbeit von caesar in die Region eingebunden ist: Die Forscher von caesar kooperieren dafür mit dem Forschungszentrum Jülich. Außerdem ist das Progesteron-Projekt mit einem Sonderforschungsbereich an der Universität Bonn verbunden.

Ergebnisse, wie die in Nature veröffentlichten, bestätigen einmal mehr, dass caesar sich vielversprechend entwickelt. Man darf gespannt sein, was das kommende Jahr bringt.



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



Prof. Dr. U. Benjamin Kaupp
Wissenschaftlicher Direktor



Gertrud Bilski
Kaufmännische Geschäftsführerin



Forschungsberichte

caesar



center of advanced
european studies
and research

Aktenzeichen XY gelöst: Die Progesteronwirkung auf menschliche Spermien

TIMO STRÜNKER, NORMANN GOODWIN UND CHRISTOPH BRENKER
Molekulare Neurosensorik

Seit 25 Jahren ist bekannt, dass Progesteron – ein weibliches Sexualhormon – das Schwimmverhalten von Spermien beeinflusst. Unklar war bislang jedoch, wie Progesteron auf die Spermien wirkt. Es ist uns nun gelungen dieses Rätsel der Spermienforschung zu lösen. Progesteron aktiviert die sogenannten CatSper-Ionenkanäle (*cation channel of sperm*) in der Membran des Spermischwanzes.

Beim Geschlechtsakt gibt der Mann etwa 280 Millionen Spermien in den weiblichen Genitaltrakt ab. Das hört sich nach viel an, ist aber vergleichsweise wenig: Ein Eber bringt es auf etwa 8 Milliarden Spermien im Ejakulat! Schweine sind damit die Rekordhalter unter den Säugetieren, während der Mensch gerade mal so viele Spermien wie

ein Karnickel produziert. Der Weg zur Eizelle ist für die Spermien anstrengend und verlustreich. Beim Menschen gelangen von den 280 Millionen Spermien lediglich einige hundert in die Nähe der Eizelle, der Rest bleibt auf der Strecke (Abbildung 1a).

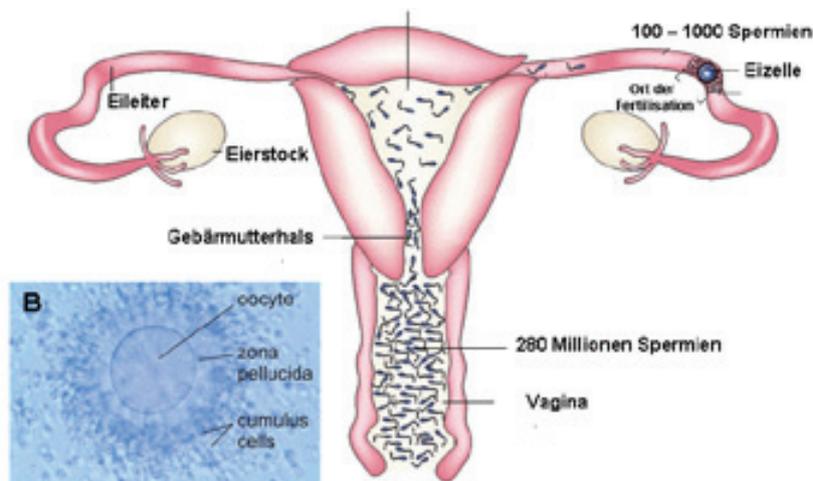


Abbildung 1: Der weibliche Genitaltrakt (in Anlehnung an Eisenbach *et al.*, Nature 2006). a. Beim Eisprung wird in einen der beiden Eileiter eine Eizelle entlassen. Im hinteren Teil des Eileiters wartet die Eizelle auf ihre Befruchtung. Von den durchschnittlich 280 Millionen Spermien, die ein Mann beim Geschlechtsakt in der Vagina „deponiert“, gelangen lediglich einige hundert in die Nähe der Eizelle. b. Mikroskopische Aufnahme der Eizelle (Oocyte). Die Eizelle ist umgeben von einer Schutzhülle (*zona pellucida*) aus Glykoproteinen und einer Wolke aus Kumuluszellen (*cumulus cells*). Die Kumuluszellen geben das weibliche Sexualhormon Progesteron ab (nicht gezeigt).

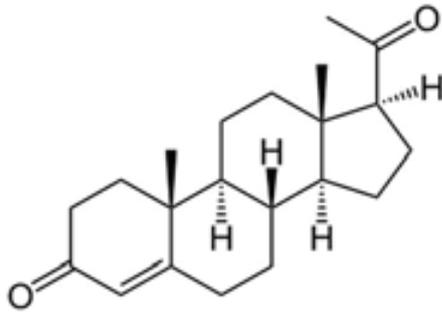


Abbildung 2: Chemische Strukturformel von Progesteron, einem weiblichen Sexualhormon.

Die Eizelle erwartet die Spermien im hinteren Teil des Eileiters und weist den orientierungslosen Spermien den Weg. Um die Befruchtung sicherzustellen, produzieren Kumuluszellen, die die Eizelle einhüllen (Abbildung 1b), das weibliche Sexualhormon Progesteron.

Progesteron (Abbildung 2) fungiert als Lockstoff für die Spermien. Die Spermien folgen der Progesteronfährte, die von den Kumuluszellen ausgelegt wird, und finden so zur Eizelle. Progesteron ist also für die Spermien eine Art molekulares Navigationssystem! Neben der „anziehenden“ Wirkung hat Progesteron noch eine weitere Funktion: In unmittelbarer Nähe zur Eizelle – dort, wo seine Konzentration am höchsten ist – löst es eine „Hyperaktivierung“ der Spermien aus. Hyperaktive Spermien schlagen wild mit ihrem Schwanz und scheinen dabei letzte Kraftreserven zu mobilisieren. Progesteron schaltet bei den Spermien praktisch den „Turbo“ ein - wie ein Marathonläufer auf der Zielgeraden. Hohe Progesteronkonzentrationen lösen zudem die Akrosomreaktion bei den Spermien aus. Bei der Akrosomreaktion setzen die Spermien aus einem Bläschen im Kopf einen enzymatischen Verdauungscocktail frei, der die schützende Eihülle verdaut und durchlässiger macht. Die Progesteronwirkung stellt also sicher, dass Spermien die dichte Wolke aus Kumuluszellen und die

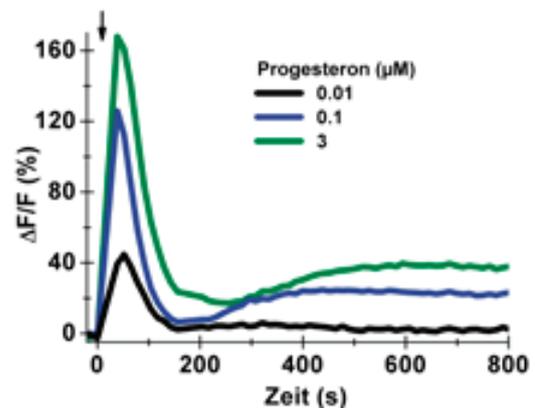


Abbildung 3: Progesteron-induzierte Ca^{2+} -Signale in menschlichen Spermien. In den Vertiefungen von sogenannten Multititerplatten wurden Spermien (~ 40.000 Spermien pro Vertiefung) mit Progesteron stimuliert. In die Spermien wurden vor dem Experiment ein fluoreszierendes Ca^{2+} -Indikatorfarbstoff eingeschleust. Der Farbstoff wird in den Spermien zur Fluoreszenz angeregt. Änderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration können anhand der Änderungen der Indikatorfluoreszenz ausgelesen werden (F = Fluoreszenz). Die Spermien wurden zum Zeitpunkt $t = 0$ (Pfeil) mit Progesteron stimuliert.

schützende Eihülle durchdringen können.

Über welchen Mechanismus löst Progesteron diese Verhaltensweisen aus? Schon seit langem weiß man, dass Progesteron die Konzentration von Kalziumionen (Ca^{2+}) im Inneren der Spermien ändert. Abbildung 3 zeigt den Verlauf von Ca^{2+} -Signalen in menschlichen Spermien nach der Zugabe von Progesteron. Die Konzentration von Ca^{2+} im Inneren des Spermiums haben wir durch einen Ca^{2+} -Indikator verfolgt, den wir in die Spermien eingeschleust haben. Durch die Progesteronstimulation steigt die Ca^{2+} -Konzentration in den Spermien an, kehrt dann fast auf das Ausgangsniveau zurück und pendelt sich schließlich auf ein leicht erhöhtes Niveau ein. Je mehr Progesteron verwendet wird, desto größer und schneller sind die Ca^{2+} -Änderungen. Diese Ca^{2+} -Signale ändern das Schlagmuster des Spermischwanzes und steuern

so die Schwimmbahn der Spermien. Bei hohen Progesteronkonzentrationen lösen sie zusätzlich eine Hyperaktivierung und die Akrosomreaktion aus. Dass Progesteron die Ca^{2+} -Konzentration in den Spermien ändert, war schon lange bekannt. Der Mechanismus blieb Spermienforschern bisher allerdings ein Rätsel [1]. Im Laufe der Jahre wurden unzählige wissenschaftliche Arbeiten zu diesem Thema veröffentlicht – mit immer komplizierteren Modellen für die Progesteronwirkung. Trotz intensiver Forschung musste sich die Wissenschaft bis vor kurzem noch eingestehen: Nichts Genaues weiß man... Jetzt ist es uns und einer US-amerikanischen Arbeitsgruppe gelungen, den Wirkungsmechanismus für Progesteron in den Spermien aufzuklären [2, 3].

Vor einigen Jahren wurde bei Mäusen in der Membran des Spermischwanzes ein Ionenkanal entdeckt, der die Ca^{2+} -Konzentration und damit das Spermienverhalten steuert. Ionenkanäle sind porenbildende Proteine, die in der Zellmembran als Schleusen für Ionen fungieren. Spermien besitzen spezielle Ca^{2+} -Ionenkanäle, sogenannte CatSper-

Kanäle (*cation channel of sperm*). CatSper-Kanäle findet man ausschließlich in Spermien und dort auch nur in der Membran des Spermischwanzes. Keine andere Zelle des menschlichen Körpers besitzt CatSper-Kanäle. Mäuse, die gentechnisch so verändert wurden, dass ihnen CatSper-Kanäle fehlen, sind unfruchtbar. Äußerlich sind diese Mäuse und ihre Spermien völlig normal. Allerdings können die Spermien von CatSper-*knock-out*-Mäusen nicht mehr hyperaktivieren; die Befruchtung der Eizelle scheitert [4]. CatSper-Kanäle steuern also das Schwimmverhalten der Spermien - viel mehr war nicht bekannt über die Kanalfunktion. CatSper-Kanäle findet man auch in menschlichen Spermien. Wie die CatSper-*knock-out*-Mäuse sind Männer unfruchtbar, wenn sie einen Defekt in dem CatSper-Gen aufweisen. CatSper-Kanäle sind also auch beim Menschen essentiell für die Befruchtung. Die Spermien solcher „CatSper-*knock-out*-Männer“ sehen, wie bei den Mäusen, auf den ersten Blick ganz normal aus. Wir konnten nun zeigen, dass Progesteron eben diese CatSper-Kanäle im Spermischwanz öffnet [3], wodurch Ca^{2+} in die Zelle einströmt (Abbildung 4).

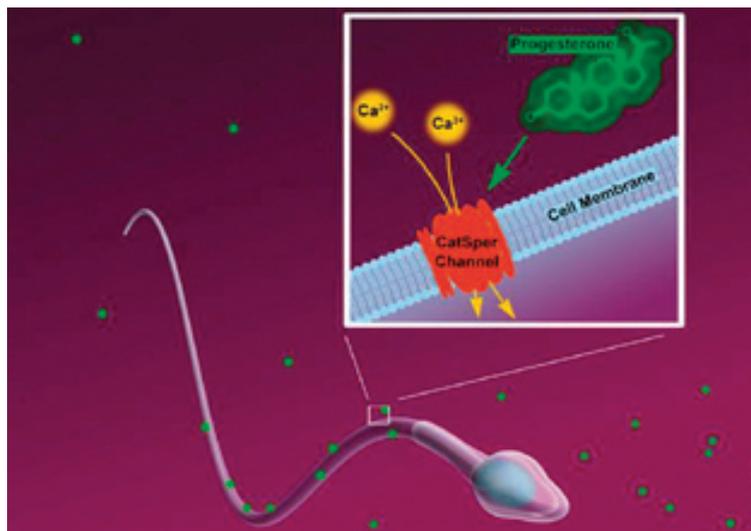


Abbildung 4: Das weibliche Hormon Progesteron (grün) wirkt auf die CatSper-Kanäle (rot) im Spermischwanz, die daraufhin Ca^{2+} (gelb) einströmen lassen.

Unsere Entdeckung ist bemerkenswert. Warum? Wir konnten experimentell zeigen, dass der Wirkungsmechanismus von Progesteron viel einfacher abläuft als gedacht. Die Öffnung der CatSper-Kanäle durch Progesteron funktioniert direkt, ohne Umweg – das hat uns selbst überrascht. All die mehrstufigen komplizierten Modelle, die zuvor für die Progesteronwirkung entwickelt wurden, mussten über Bord geworfen werden. Um CatSper zu öffnen, nimmt Progesteron den kürzesten Weg: Es bindet entweder direkt an den Kanal oder an ein Protein, das mit dem Kanal verbunden ist. Die genaue Progesteronbindestelle kennen wir noch nicht – wir arbeiten aber daran zur Zeit mit Hochdruck! Unsere Arbeit liefert somit neue Erkenntnisse über die Rolle der CatSper-Kanäle in Spermien. Die Kanäle steuern das Schwimmverhalten der Spermien. Soviel war

bekannt. Erstaunlich ist aber, dass die CatSper-Kanäle den Rezeptor für den Lockstoff Progesteron darstellen.

Wieso blieb der Wirkungsmechanismus von Progesteron so lange rätselhaft? Wir konnten das Progesteronrätsel nur durch den Einsatz modernster elektrophysiologischer und optischer Techniken lösen. Wir haben z.B. die sogenannte *patch-clamp*-Technik bei den Spermien angewendet: Hierbei wird eine feine Glaselektrode vorsichtig auf die Membran des Spermiums aufgesetzt (Abbildung 5a). Damit konnten wir die Ionenströme durch CatSper-Kanäle und die Aktivierung durch Progesteron direkt messen (Abbildung 5b). Diese Messmethode wurde erstmals im Jahre 2010 erfolgreich an menschlichen Spermien angewendet.

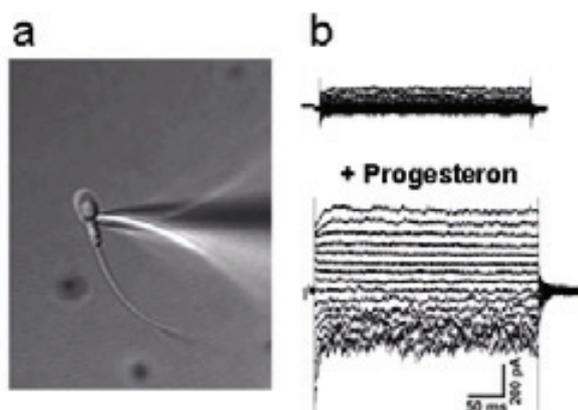


Abbildung 5: Progesteron-induzierte CatSper-Ströme, aufgenommen mit der patch-clamp-Technik. a. Eine Glaselektrode wird vorsichtig im Bereich des „Nackens“ auf das Spermium aufgesetzt (Bild aus [4]). Anschließend wird die Membran unter der Elektrodenöffnung durch einen kurzen Saugimpuls zerstört; so erhält man einen elektrischen Zugang zum Zellinneren. Mit dieser Technik können die winzigen Ströme – wenige hundert Picoampere (pA) – über Ionenkanäle in der Spermienmembran gemessen werden. b. CatSper-Ströme in menschlichen Spermien in Abwesenheit (oben) und Anwesenheit (unten) von Progesteron. Die CatSper-Ströme wurden bei Membranspannungen von -80 mV bis +80 mV aufgenommen. Man erkennt deutlich, dass Progesteron die Stromamplituden erhöht.

Wir konnten mit dieser Methode zeigen, dass nicht nur Progesteron, sondern auch Prostaglandine (Prostaglandin E1, Abbildung 6) CatSper-Kanäle aktivieren. Prostaglandine werden, genau wie Progesteron, von den Kumuluszellen abgegeben. Im Gegensatz zu Progesteron ist die Prostaglandinwirkung auf Spermien kaum untersucht. Man wusste lediglich, dass Prostaglandine in menschlichen Spermien Ca^{2+} -Antworten auslösen, die den Progesteronantworten stark ähneln. Das lässt vermuten, dass neben Progesteron auch Prostaglandine eine entscheidende Rolle bei der Befruchtung spielen.

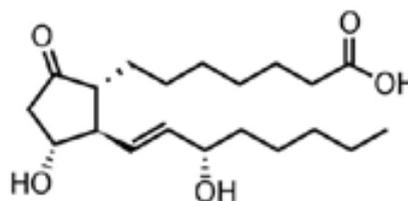


Abbildung 6: Struktur von Prostaglandin E1, einem Geweshormon, das in Spermien CatSper-Kanäle aktiviert.

Dass Progesteron und Prostaglandine die CatSper-Kanäle aktivieren, könnte auch medizinisch von großer Bedeutung sein: Wenn es gelänge, die Wechselwirkung mit dem Ionenkanal spezifisch zu stören, könnte man neue, noch besser verträgliche Verhütungsmittel entwickeln. Von der aktuellen wissenschaftlichen Erkenntnis bis zum innovativen Verhütungsmittel ist es jedoch noch ein weiter Weg.

Referenzen

[1] Baldi, E., Luconi, M., Muratori, M., Marchiani, S., Tamburrino, L., and Forti, G. (2009) "Nongenomic activation of spermatozoa by steroid hormones: facts and fictions" *Mol. Cell Endocrinol.* 308, 39-46

[2] Strünker, T., Goodwin, N., Brenker, C., Kashikar, N.D., Weyand, I., Seifert, R., and Kaupp, U.B. (2011) "The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca^{2+} influx in human sperm" *Nature* 471, 382-386

[3] Lishko, P.V., Botchkina, I.L., and Kirichok, Y. (2011) "Progesterone activates the principal Ca^{2+} channel of human sperm" *Nature* 471, 387-391

[4] Lishko, P.V., Botchkina, I.L., Fedorenko, A., and Kirichok, Y. (2010) "Acid extrusion from human spermatozoa is mediated by flagellar voltage-gated proton channel" *Cell* 140, 327-337

caesar



center of advanced
european studies
and research

Sperm's egg-seeking secrets revealed

GENELLE WEULE

ABC Science Online, 17.03.2011

Sperm may be fast and hard to pin down, but scientists have uncovered the mechanism behind how these cells zero in on an egg and fertilise it. The discovery could lead to the development of non-hormone based contraceptives for men and women that do not have side-effects. For more than two decades scientists have known that the sex hormone progesterone, released from ovulated eggs, stimulates the flow of calcium ions (Ca^{2+}) in sperm. This reaction helps sperm identify and swim toward the egg, as well as break through the egg's protective covering to fertilise it.

But scientists were unsure about how progesterone did it. According to two studies published in this

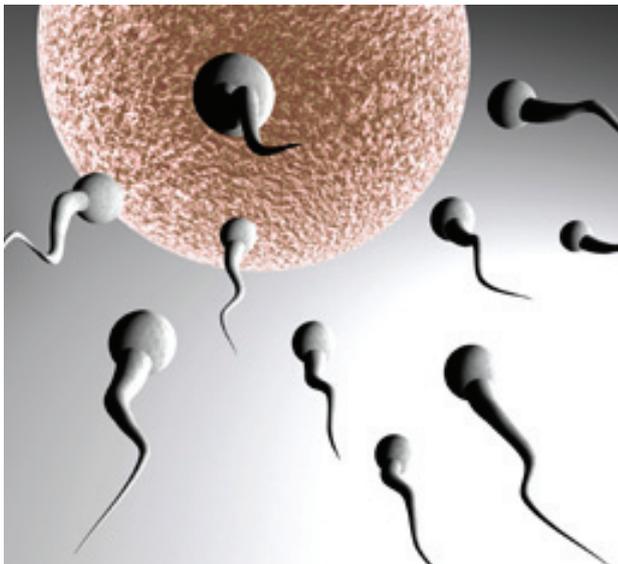


Figure 1: The discovery could lead to the development of non-hormone based contraceptives for men and women. (www.sxc.hu)

week's issue of Nature, progesterone activates a calcium ion channel, known as CatSper, which is found in the sperm's tail or flagellum.

Researchers from the University of California San Francisco studied sperm cells using a technique they pioneered called sperm patch-clamp technique. The sperm is pinned down between the head and the tail, where the cell membrane is softer, using a glass pipette. A small hole is punctuated through the membrane and the material inside the cell is replaced by a solution. Calcium ions were then „passed through“ the CatSper channel to create an electrophysiological fingerprint.

„By studying the CatSper channel electrophysiologically in isolation from all other ion channels or transporters, we were able to prove that the CatSper channel is activated by progesterone and is the long-sought elusive progesterone receptor of human sperm,“ said the study's lead author Dr Polina Lishko.

In the second study appearing in Nature, German researchers observed sperm loaded with calcium-sensitive fluorescent dye to detect the presence of calcium ions, in addition to the patch-clamp technique, and reached a similar conclusion.

„Although we don't know the exact binding site for progesterone, we can conclude that progesterone binds to the CatSper channel itself or to a directly associated protein,“ said lead author Dr Strünker, of the



Centre of Advanced European Studies and Research
in Bonn.

Impact on fertility

The research findings are hugely significant, says Dr Lishko, because mutations of the CatSper channel, are known to cause complete male infertility. „Without it [the CatSper channel] sperm cannot penetrate the protective vestments of the ovulated egg and cannot fertilise it,“ she said. Dr Lishko says that because the CatSper channel is found nowhere else in the body except sperm it offers the potential to develop specifically targeted contraceptives.

Unlike traditional hormone-based contraceptives, which target the progesterone receptors in all the body's cells causing side effects such as weight gain, abdominal cramps and mood swings, the binding site for progesterone on the CatSper channel is unique. „Therefore potential development of unisex contraceptives which target a molecule unique for the sperm ... is possible,“ Dr Lishko said. “Such a contraceptive should have minimal side effects, because it will target the molecule not present in the female body, only in the male body, and only on sperm.”

Professor John Aitken, director of the ARC Centre of Excellence in Biotechnology and Development, says both papers are an important finding in the field of reproductive cell biology. “People have tried for many years to understand the nature of the receptor for progesterone. Several people have published papers saying that they have identified said molecule, but none of those identifications have really stood the test of time,” he said. “So these two papers are certainly a milestone in the field.”

Der Lockruf der Eizelle

ANDREAS FISCHER

Welt am Sonntag, 20.03.2011

Nicht nur Duft von Maiglöckchen, sondern auch ein Sexualhormon helfen Spermien, sich im Eileiter zurechtzufinden. Progesteron weist den Spermien den Weg zum Ei, Kalziumionen schalten ihren Turboantrieb ein.

Im Eileiter ist es dunkel. Um dennoch möglichst schnell den Weg zur Eizelle zu finden, nutzen Spermien chemische Signale. Das weibliche Sexualhormon Progesteron sorgt dafür, dass die Spermien im Eileiter zur Eizelle gelangen. Dabei lässt es Kalzium in den Motor der Spermien einströmen und treibt so die Bewegung in Richtung der Eizelle an. Dies veröffentlichten Wissenschaftler des Bonner Forschungszentrums caesar und der Universität von Kalifornien in der aktuellen Ausgabe des Journals „Nature“. Erstmals gelang es den Forschern, in Anwesenheit von Progesteron elektrische Ströme in Spermazellen zu messen. Das Resultat ist eine schnellere und gezielte Bewegung in Richtung der Progesteronquelle.

Um die Spermien auf die Eizelle aufmerksam zu machen, schütten Zellen der Eihülle das Hormon Progesteron aus. Damit lockt das Ei die Spermien durch den Eileiter zu sich. Auf ihrer Suche nach der Eizelle bewegen sich Spermien durch Schlagen mit dem Schwanz fort und steuern so auch die Bewegungsrichtung. Treffen sie unterwegs auf Progesteron, dann öffnet dieses bestimmte Kalziumkanäle in der Spermienmembran. Die Kanäle befinden sich ausschließlich in der Motorregion des Schwanzes nahe am Kopf.

Der an den Spermien gemessene Strom entsteht durch das Eintreten von elektrisch geladenem Kalzium. „Kommt es durch Progesteron zum Öffnen der Kalziumkanäle, strömen Kalziumionen ins Innere der Spermien und wirken auf deren molekularen Motor. Sie steuern die Schwimmrichtung und schalten praktisch den Turbo ein“, erklärt caesar-Wissenschaftler Timo Strünker.

Mehr Kalzium führt dazu, dass die Spermien stärker mit dem Schwanz schlagen und so der zunehmenden Progesteronkonzentration folgen. Haben sie die Eizelle erreicht, „verdauen“ sie sich durch die Eihülle und können mit dem Ei verschmelzen. „Spermien haben im Kopf ein Bläschen mit Verdauungsenzymen, das Akrosom. Beim Kontakt mit der Eihülle öffnet sich das Bläschen und die Eihülle wird verdaut“, sagt Strünker. Außerdem löst Progesteron in direkter Umgebung der Eizelle über den erhöhten Kalziumeinstrom eine Hyperaktivität der Spermien aus. So können sie die Eihülle noch besser durchdringen.

Bei ihren Experimenten bedienen sich die Forscher der Nobelpreis-gekrönten Patch-Clamp-Technik. Dabei müssen sie eine Elektrode in die Zelle einführen. Eine zweite Elektrode befindet sich außerhalb der Zelle in der umgebenden Flüssigkeit. Fließt zwischen



beiden Elektroden ein Strom, ist das ein Zeichen für geöffnete Ionenkanäle in der Zellmembran. Bisher blieb das Verfahren an Spermien aber erfolglos, da das Einstechen der Elektrode in die kleinen, stark beweglichen Zellen nicht glückte. Die Wissenschaftler der Universität von Kalifornien verfeinerten nun diese Technik.

Zusätzlich zeigten die Forschergruppen, dass Progesteron entweder direkt an die Kalziumkanäle bindet oder an ein assoziiertes Protein. Diese Bindung öffnet dann die Schleusen in der Spermienmembran. Wie genau aber Kalzium den Motor beschleunigt, bleibt weiterhin ein Rätsel. Dass ein Lockstoff die Spermien zur Eizelle führt, war allerdings schon bekannt. Forscher um Hanns Hatt zeigten, dass Spermien einem künstlichen Maiglöckchenduft folgen. Die verwendete Substanz kommt normalerweise als Duftzusatz in der Kosmetik zum Einsatz, verdoppelt aber auch das Bewegungstempo von Spermien.

Mit der Identifizierung von Progesteron als „große Unbekannte“ ergeben sich auch neue medizinische Perspektiven. „Mit diesem Wissen können neue, besser verträgliche Verhütungsmittel entwickelt werden. Dazu müsste man eine Substanz herstellen, die die Wirkung von Progesteron auf die Kalziumkanäle unterbindet. So könnte man verhindern, dass die Spermien im Eileiter die Fährte der Eizelle aufnehmen“, sagt Strünker. Darüber hinaus könnten die Erkenntnisse dabei helfen, einige Ursachen männlicher Unfruchtbarkeit aufzuklären.

Das *Titan KRIOS* – Ein neues Werkzeug für die Kryo-Elektronenmikroskopie

STEPHAN IRSEN, MONIKA FRITZ UND ASHRAF AL-AMOUDI
Elektronenmikroskopie und Analytik

Biologische Strukturen im Nanometerbereich lassen sich mit Hilfe der Kryo-Elektronentomographie untersuchen. Das *Titan KRIOS* ist ein Hochleistungs-Transmissionselektronenmikroskop, das speziell für solche Untersuchungen entwickelt wurde. Automatisierung und ein neuartiger Detektor erlauben Messungen mit bislang nicht erreichter Qualität.

Um die Funktion eines biologischen Systems zu verstehen, muss man seine Struktur kennen. Strukturen im Bereich von einigen μm bis zu ungefähr 200 nm lassen sich noch mit einem Lichtmikroskop untersuchen. Kleinere Strukturen, wie Zellorganellen oder makromolekulare Komplexe, können mit Hilfe eines Transmissionselektronenmikroskops (TEM) analysiert werden. Abbildung 1 zeigt ein Sehstäbchen aus der Netzhaut einer Maus, aufgenommen mit einem TEM. Bei der Probe handelt es sich um einen Ultradünnschnitt, eingebettet in amorphes Eis.

Zellen und biologisches Gewebe bestehen zu mehr als 70% aus Wasser. Im Vakuum des Elektronenmikroskops würde Wasser verdampfen; die zu untersuchende Probe würde zerstört. Daher muss das gesamte Wasser entfernt oder so fixiert werden, dass es bei einem Vakuum von bis zu 10^{-8} mbar stabil bleibt.

Die Struktur der Probe muss während der Probenpräparation und der anschließenden Untersuchung im TEM erhalten bleiben. Dies wird mit der CEMOVIS Technik (*cryo-electron-*

microscopy of vitreous sections) erreicht [1]. Die Probe wird bei einem Druck von 2100 bar in flüssigem Stickstoff – also bei sehr tiefen Temperaturen – eingefroren; sie wird „vitrifiziert“. Was bedeutet das? Wasser kristallisiert nicht in der Probe, sondern verwandelt sich in eine glasartige, amorphe Flüssigkeit mit sehr hoher Viskosität. Das Besondere an diesem Verfahren ist, dass der native Zustand der Probe erhalten bleibt. Anschließend wird die eingefrorene Probe mit einem Ultramikrotom bei einer Temperatur von $-160\text{ }^{\circ}\text{C}$ in dünne Schnitte von 50 bis 100 nm Dicke geschnitten. Die gefrorenen Schnitte werden anschließend im TEM untersucht.

Abbildung 1b zeigt einen Ausschnitt des Außensegments bei höherer Vergrößerung. Gut zu erkennen sind die Membranen (Lipiddoppelschichten) der *discs*. In diese Membranen ist das Sehpigment Rhodopsin eingebaut. Rhodopsinmoleküle werden durch die Absorption eines Photons angeregt und aktivieren die enzymatische Sehkaskade. Der dreidimensionale Aufbau solcher Strukturen ist von großem Interesse. Da die Transmissionselektronenmikroskopie nur zweidimensionale Bilder liefert, muss man in die wissenschaftliche

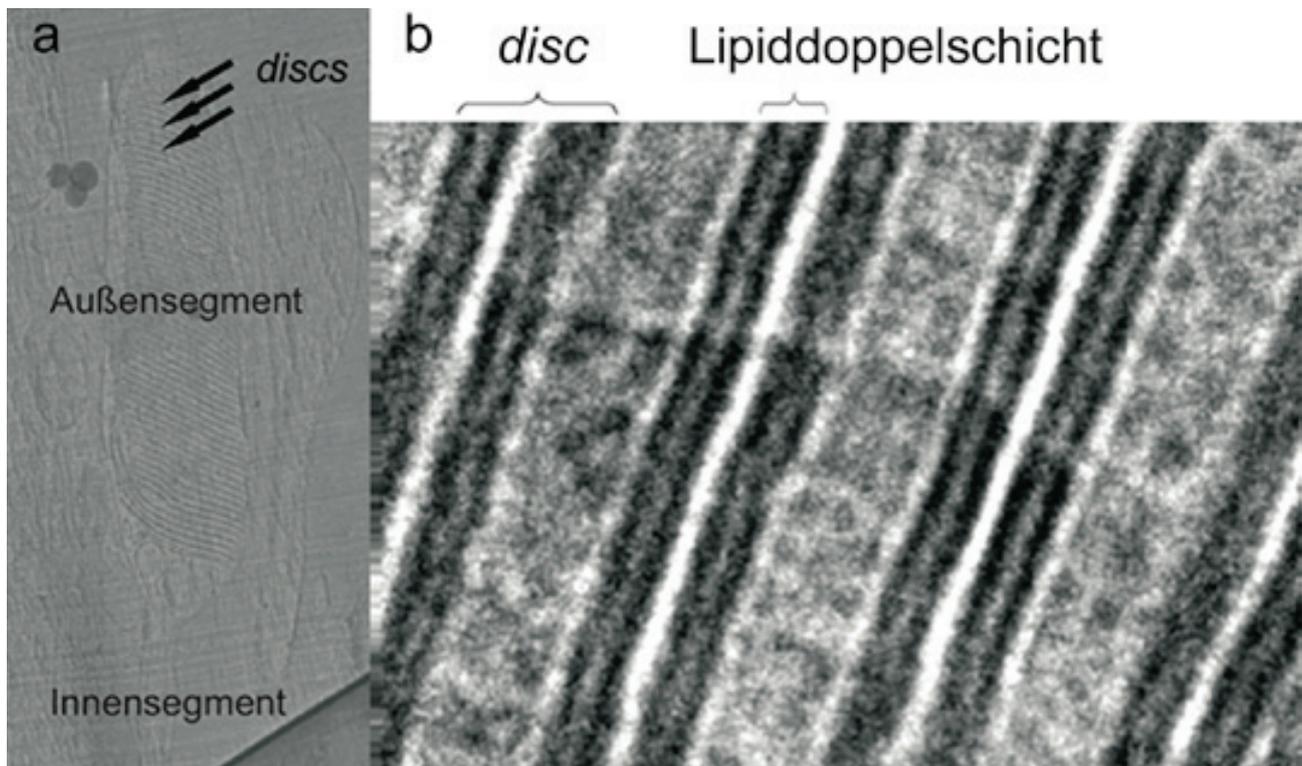


Abbildung 1: TEM-Aufnahme eines Sehstäbchens einer Maus. **a.** Im linken Bild ist eine Übersicht der gesamten Zelle zu sehen. Der lichtempfindliche Teil, die *discs* (Pfeile) befinden sich im Außensegment. **b.** Das rechte Bild zeigt eine Aufnahme der *discs* bei höherer Vergrößerung. Man kann die Lipiddoppelschicht der *disc*-Membran erkennen.

Trickkiste greifen, um die dreidimensionale Struktur zu rekonstruieren: Ähnlich wie in der medizinischen Computertomographie (CT) werden in der Kryo-Elektronentomographie Bilder aus verschiedenen Richtungen aufgenommen. Die Bilder werden anschließend im Computer zu einem Tomogramm rekonstruiert. Aus dem Tomogramm kann man die 3D-Struktur ableiten.

Um Kryo-Elektronenmikroskopie erfolgreich durchführen zu können, benötigt man ein dafür spezialisiertes TEM. Konventionelle Geräte besitzen in der Regel keine ausreichenden Kühlmöglichkeiten; die gesamte Untersuchung muss bei Temperaturen unterhalb von -160 °C durchgeführt werden. Darüber hinaus stellt die Elektronentomographie hohe Anforderungen an die Präzision der Probenbühne

und die Empfindlichkeit der Kamera. Die Probenbühne ist das Bauteil, mit dem die Probe im Mikroskop verfahren wird. Auch diese Anforderungen werden von den meisten Standard-TEMs nicht erfüllt.

Das *Titan KRIOS*

Bei caesar ist das Transmissionselektronenmikroskop *Titan KRIOS* der Firma FEI installiert. Ursprünglich wurde das *Titan* für materialwissenschaftliche Fragestellungen entwickelt. FEI hat dieses Mikroskop in den vergangenen Jahren für die Bedürfnisse der Kryo-Elektronenmikroskopie weiterentwickelt und unter dem Namen *Titan KRIOS* auf den Markt gebracht. Im Mikroskop lassen sich Proben-temperaturen von -180 °C einstellen. Entscheidend ist, dass diese Temperatur über längere Zeiträume stabil gehalten werden kann. Wie wird das erreicht?

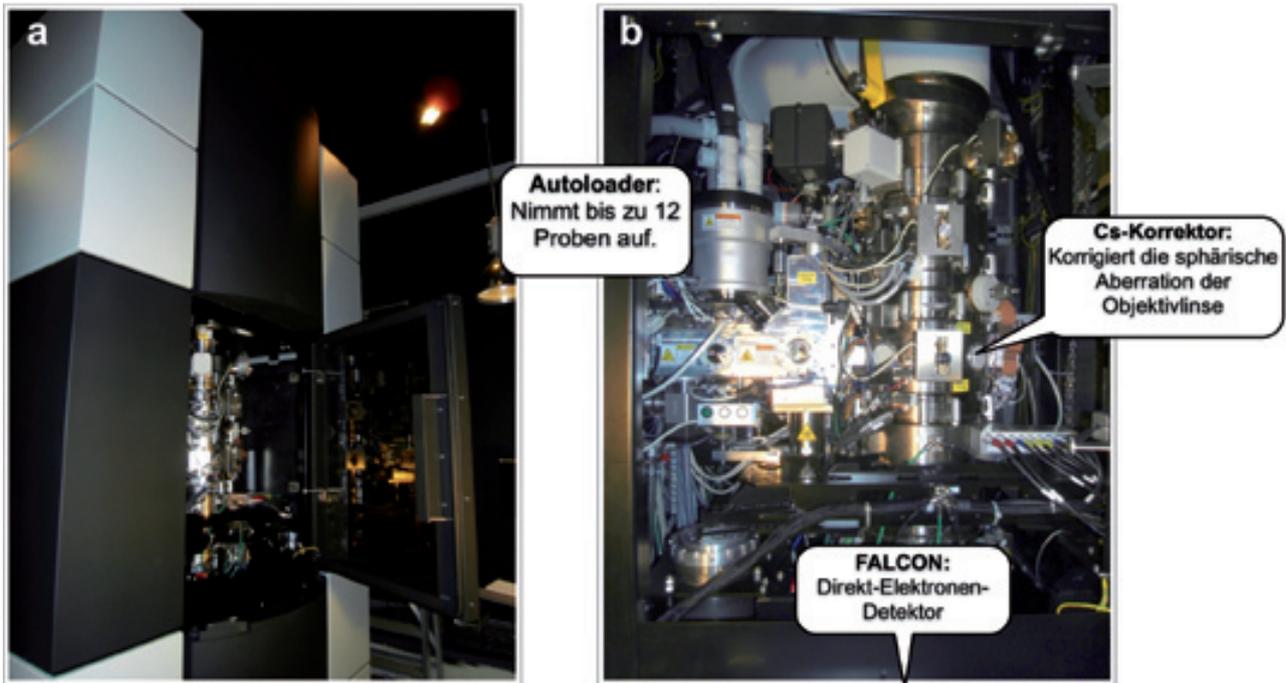


Abbildung 2: Darstellung des bei caesar installierten Titan KRIOS. Das linke Bild zeigt eine Gesamtdarstellung des Geräts inkl. Verkleidung. Das TEM hat eine Höhe von 3,80 m. Die geöffnete Türe gibt den Blick auf die Säule frei. Das rechte Bild zeigt eine detailliertere Aufnahme der Säule. Hier sind zwei der drei Hauptkomponenten des Mikroskops - der Autoloader und der Cs-Korrektor - gut zu erkennen.

Der gesamte Probenraum ist von einer sogenannten Kryo-Box umschlossen. Diese besitzt eine niedrigere Temperatur (-190 °C) als die Probe selbst und wirkt als „Kühlfalle“: Im Mikroskop befindliche Verunreinigungen kondensieren auf der Kryo-Box. Dadurch lässt sich eine Probe im *KRIOS* über einen Zeitraum von mindestens drei Tagen untersuchen, ohne dass sich das Eis aufgrund von Kontaminationen verändert. Zum Vergleich: Selbst in guten konventionellen Kryo-TEMs sind bislang nur Untersuchungszeiten von maximal einem Tag möglich.

Abbildung 2 zeigt das bei caesar installierte Gerät. Durch die vollständige Verkleidung werden Störungen, zum Beispiel Vibrationen oder Temperaturschwankungen, auf ein Minimum reduziert. Das Mikroskop wird nicht mehr, wie sonst üblich, im selben

Raum bedient, sondern ferngesteuert. Störeinflüsse des Bedieners auf das Gerät werden so minimiert. Abbildung 2b zeigt eine Innenansicht des Mikroskops. In der Abbildung sind drei Hauptkomponenten hervorgehoben, die im Folgenden ausführlicher beschrieben werden.

Der Autoloader: Alles automatisch

Die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur von Proteinen oder anderen subzellulären Strukturen erfordert sehr große Datenmengen. Im Bereich der Einzelpartikelanalyse ist es üblich 10.000 und mehr Bilder einer Probe aufzunehmen [2]. Um diese Arbeit zu vereinfachen, lässt sich das *KRIOS* vollständig automatisieren. Durch seinen Probenroboter, den sog. Autoloader kann es bis zu 12 Proben gleichzeitig aufnehmen und automatisiert analysieren.



Abbildung 3: Ein gefülltes Weinglas demonstriert die optische Qualität einer Magnetlinse. Nur im Zentrum des gefüllten Weinglases, nahe der optischen Achse, ist die vergrößerte Abbildung störungsfrei.

Der Autoloader vereinfacht zudem den Proben-transfer; in einer Kassette können die Proben in flüssigem Stickstoff präpariert werden. Der Probenroboter entnimmt die Probenkassette und überführt sie ins Vakuum des TEMs. Durch diese Automatisierung lässt sich das Gerät im 24 Stunden-Dauerbetrieb nutzen.

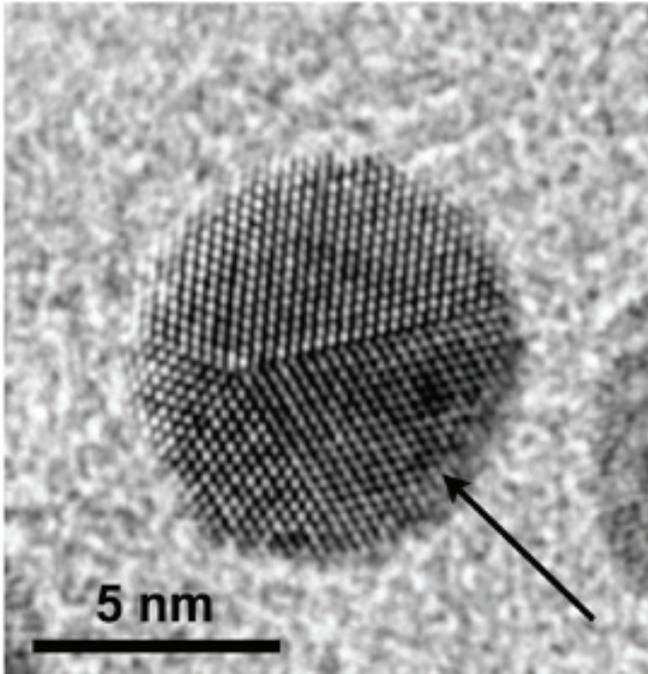
Der Cs-Korrektor: Eine „Brille“ für Elektronenlinsen

In einem Elektronenmikroskop werden Elektronenstrahlen mit Hilfe von Magnetlinsen abgelenkt bzw. fokussiert. Die Stärke des Magnetfeldes bestimmt die Brennweite der Linse; die Brennweite lässt sich so über einen weiten Bereich variieren. Dadurch kommt ein Elektronenmikroskop mit einer einzigen Objektivlinse aus, während ein Lichtmikroskop in der Regel mehrere Objektive besitzt. Verglichen mit Glaslinsen sind Magnetlinsen etwa 100-mal schlechter; die optische Qualität lässt sich mit der von wassergefüllten Weingläsern vergleichen (Abbildung 3).

Im TEM kann eine gute Abbildungsqualität deshalb nur nahe der optischen Achse der Linse erreicht werden, bei minimalem Öffnungswinkel (wenige mrad). Außerhalb dieses Bereichs kommt es zu Abbildungsfehlern (Aberrationen) der Linse. Der Effekt ist in Abbildung 3 gut zu erkennen. Einige Aberrationen lassen sich über zusätzliche optische Elemente in Standard-TEMs einfach korrigieren. Andere Abbildungsfehler wie etwa der Öffnungsfehler (die sogenannte Sphärische Aberration oder Cs) sind schwieriger in den Griff zu bekommen. In Lichtmikroskopen oder anderen lichtoptischen Systemen kann man Cs relativ einfach über eine asphärische Linse korrigieren. In der Elektronenmikroskopie stehen solche Linsen nicht zur Verfügung. Schon 1936 wurde von Scherzer vorgeschlagen, die sphärische Aberration der Objektivlinse in einem TEM durch Kombination verschiedener Multipol-Linsen zu korrigieren [3]. Eine Multipol-Linse besitzt mehr als nur ein magnetisches Polpaar (Nord- und Südpol); Hexapol-Linsen besitzen zum Beispiel sechs solcher Polpaare. Es sollte aber noch mehr als 50 Jahre dauern, bis Hexapol- und Quadrupol-Korrektoren mit ausreichender Genauigkeit realisiert werden konnten [4]. Das bei caesar installierte *KRIOS* besitzt einen solchen Cs-Korrektor. Dieser kann die sphärische Aberration der Objektivlinse und andere Abbildungsfehler korrigieren.

Im Bereich der Hochauflösungsmikroskopie an materialwissenschaftlichen Proben werden Cs-Korrektoren häufig eingesetzt (Abbildung 4). Bei biologischen Proben kommen sie bislang eher selten zum Einsatz. Es zeigt sich jedoch zunehmend, dass mit Cs-Korrektoren auch bei biologischen Proben Bildqualität und erreichbare Auflösung deutlich gesteigert werden können. Insbeson-

Cs = 1200 μm



Cs = -5 μm



Abbildung 4: Hochauflösungsaufnahmen von Gold-Nanopartikeln, ohne (links) und mit (rechts) Cs-Korrektor. Ohne Cs-Korrektor lässt sich nicht zweifelsfrei feststellen, wo die Goldatome lokalisiert sind (s. Pfeil). Im rechten Bild befinden sich alle Goldatome in derselben Fokusebene; sie erscheinen alle weiß.

dere bietet der Cs-Korrektor die Möglichkeit, die Beschleunigungsspannung des Mikroskops zu verringern, ohne dass die Auflösung leidet. Mit dem *Titan KRIOS* lässt sich auch bei nur 80 kV Beschleunigungsspannung (statt 300 kV) eine Auflösung von 200 pm (und besser) erreichen. Das Arbeiten bei reduzierter Beschleunigungsspannung hat zwei positive Effekte: Der Bildkontrast wird verbessert und Strahlenschäden an den gefrorenen Proben werden reduziert.

CMOS, ich seh was!

Das menschliche Auge kann Elektronenstrahlen nicht direkt wahrnehmen. Daher werden sie in Elektronenmikroskopen auf einem Fluoreszenzschirm in sichtbares Licht umgewandelt. Fluoreszenzschirme sind Platten, die mit Zink-

sulfid oder einer Mischung aus Zink- und Cadmiumsulfid beschichtet sind. Diese Materialien werden bei Bestrahlung mit Elektronen angeregt und emittieren Licht im sichtbaren Bereich des Spektrums. Das Emissionsmaximum kann durch Beimengen von Metallen variiert werden. Man stellt es üblicherweise im grün-gelben Bereich (550 nm) ein, da das menschliche Auge in diesem Wellenlängenbereich besonders empfindlich ist.

Zur dauerhaften Aufzeichnung von Bildern in einem TEM wurden bis vor ca. 10 Jahren photographische Filme verwendet. Diese können direkt mit Elektronen bestrahlt werden. Die Elektronen treffen auf die Silberhalogenide in der Photoemulsion und ionisieren diese, so dass sie - wie im normalen photographischen Prozess - zu Silber reduziert werden.

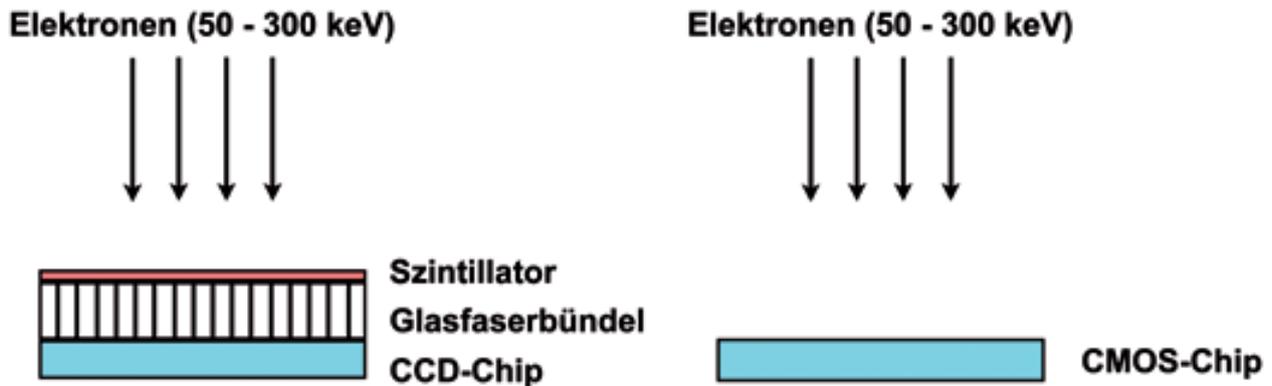


Abbildung 5: Schematischer Aufbau eines CCD-Detektors, im Vergleich zu einem CMOS.

Die Entwicklung von digitalen Bildsensoren hat den photographischen Film mittlerweile fast vollständig aus dem TEM verdrängt. Als Standarddetektor im TEM werden heute CCD-Kameras (*Charge-Coupled Device*) eingesetzt. Diese bestehen aus einem zweidimensionalen Photodiodenarray, in dem auftreffende Photonen in Elektronen umgewandelt und anschließend ausgelesen werden. Der CCD-Chip kann nicht direkt mit beschleunigten Elektronen bestrahlt werden. Diese hohe kinetische Energie würde die Halbleiterstrukturen des Detektors beschädigen und damit die Empfindlichkeit herabsetzen. Die Elektronen müssen daher zunächst in einem Szintillator - analog zum Fluoreszenzschirm - in sichtbares Licht umgewandelt und dann mit Hilfe von Lichtleitern auf den CCD-Chip übertragen werden. Dies verschlechtert das Signal-Rausch-Verhältnis des Detektors. Vergleicht man das Signal-Rausch-Verhältnis vor und hinter dem Detektor, erhält man eine wichtige Kenngröße für Detektoren, die *Detection Quantum Efficiency* (DQE). Für sie gilt im optimalen Fall $DQE = 1$. Für die derzeit besten in TEMs einsetzbaren CCD-Kameras erreicht man Werte von $DQE = 0,1$.

In den letzten Jahren hat sich in der digitalen Bildaufzeichnung neben CCD-Kameras eine andere Detektor-Technologie zunehmend durchgesetzt: der CMOS-Detektor. Im Gegensatz zum CCD-Detektor handelt es sich beim *Complementary Metal Oxide Semiconductor* (CMOS) um einen aktiven Bildsensor. Die Photonen werden analog zum CCD in Elektronen umgewandelt. Die Verstärkung und das Auslesen finden, im Gegensatz zum CCD, direkt in den Detektorpixeln statt. Dadurch kann ein CMOS sehr viel schneller ausgelesen werden als ein CCD. Aufgrund der hohen Auslese-rate und der Struktur der CMOS-Chips können sie im Gegensatz zu CCD-Chips direkt mit beschleunigten Elektronen bestrahlt werden; eine Umwandlung der Elektronen in Photonen ist nicht nötig. So lässt sich das Signal-Rausch-Verhältnis um das 3- bis 5-fache steigern ($DQE = 0,5$). Darüber hinaus lassen sich die Pixel eines CMOS einzeln auslesen. Wahrscheinlich lassen sich in Zukunft sogar einzelne Elektronen detektieren.

Das hier beschriebene *Titan KRIOS* wurde im Zeitraum von Januar bis April 2011 bei caesar installiert, getestet und in Betrieb

genommen. Ende Mai wurde es an die Wissenschaftler übergeben und steht nun als neues Hochleistungsgerät zur Verfügung.

Referenzen

[1] Al-Amoudi, A. *et al.* (2004) "Cryo-Electron Microscopy of Vitreous Sections." *EMBO J.* 23, 3583-3588

[2] Jonic, S., Sorzano, C.O., and Boisset, N. (2008) "Comparison of Single-Particle Analysis and Electron Tomography Approaches: An Overview." *J. Microsc.* 232, 562-579

[3] Scherzer, O. (1936) "Über einige Fehler von Elektronenlinsen" *Zeitschrift für Physik* 101, 593-603

[4] Urban, K., Kabius, B., Haider, M., and Rose, H. (1999) "A Way to Higher Resolution: Spherical-Aberation Correction in a 200 KV Transmission Electron Microscope" *Journal of electron microscopy* 48, 821-826

caesar



center of advanced
european studies
and research

Neues aus der Mikrobionik: Strömungssensoren der Fische helfen Trinkwasser zu sparen

MANFRED LACHER UND SIEGFRIED STELTENKAMP
Mikrosystemtechnologie

Fische verfügen über ein Seitenlinienorgan. Dieses dient den Fischen zur Wahrnehmung von Wasserbewegungen und Druckschwankungen. Vorbeischwimmende Fische erzeugen Wasserwirbel, die über das Seitenlinienorgan registriert werden. Der Fisch wird so auch in völliger Dunkelheit über seine unmittelbare Umgebung informiert. Dieses geniale biologische System nehmen wir uns zum Vorbild, um einen mikrotechnologischen Strömungssensor zu entwickeln.

Was ist Mikrobionik?

Lebewesen sind mit einer Vielzahl von Sensoren ausgestattet. Man unterscheidet aktive und passive Sensorsysteme. Aktive Sensoren senden Signale aus, um mit Hilfe der reflektierten Wellen Hindernisse wahrzunehmen. Ein bekanntes Beispiel hierfür sind die Ultraschallwellen der Fledermaus. Im Gegensatz zu aktiven Sensoren messen passive Sensoren energetische Schwankungen – und dies bei minimaler Wechselwirkung mit der Umgebung. Viele passive Sensorsysteme basieren auf mikromechanischen Prinzipien, wie zum Beispiel die Vibrations-Detektion der Spinnen, die Infrarot-Detektion des Feuerkäfers (siehe caesar-Jahresbericht 2008) oder das mechano-sensitive Seitensystem der Fische. Oft versteht man die Wirkungsweise dieser mikromechanischen Sensoren nicht im Detail. Besonders bei komplexen Systemen wie dem Seitenlinienorgan der Fische sind noch viele Fragen offen. Bis heute ist nicht genau bekannt, welche Informationen die Sensoren des Seitenlinienorgans den Fischen

liefern und wie - beziehungsweise ob überhaupt - die Fische damit ein dreidimensionales Bild der Umgebung aufbauen können.

Es gibt verschiedene Ansätze, die Funktionsweise passiver Sensoren zu untersuchen und nutzbar zu machen. Das *Ziel*: Man möchte sich die Natur zum Vorbild nehmen und biologische Sensoren technologisch nachbauen. Bislang versuchte man dies vorwiegend mit makroskopischen Methoden. Das *Problem*: Je größer ein Sensor ist, desto teurer ist er auch. Eine *Lösung*: Miniaturisierung durch Mikrosystemtechnologie! Diesen Ansatz bezeichnen wir als Mikrobionik. In der Mikrobionik werden also biologische Sensoren wissenschaftlich analysiert und so nachgebaut, dass eine industrielle Fertigung möglich wird.

Im Folgenden wollen wir am Beispiel des Seitenliniensystems der Fische das spannende Gebiet der Mikrobionik genauer vorstellen.

Der Fisch als Vorbild

Wie alle Tiere nehmen Fische Reize mit unterschiedlichen Sinnesorganen wahr. Fische können nicht nur sehen, riechen, schmecken, und hören, sondern auch Wasserbewegungen über ein Seitenliniensystem wahrnehmen (Abbildung 1). Dieses Sinnesorgan besteht aus mehreren tausend hochempfindlichen Sensoren, den sogenannten Neuromasten. Diese befinden sich auf der Kopf- und Körperoberfläche (Epidermalneuromasten) sowie in flüssigkeitsgefüllten Kanälen (Kanalneuromasten).

Neuromasten bestehen aus einem Sinnesepithel, das mehrere tausend Haarsinneszellen enthält. Haarsinneszellen der Seitenlinie besitzen ein randständiges, langes Sinneshärchen, das sogenannte Kinozilium, sowie eine Vielzahl von Stereovilli, deren Länge in Richtung zum Kinozilium gleichförmig zunimmt. Stereovilli und Kinozilium der Haarsinneszellen ragen in eine gallertige, umhüllende Struktur, die *Cupula*, hinein. Die *Cupula* steht in direktem Kontakt mit dem umgebenden Wasser oder mit der Kanalflüssigkeit (Abbildung 1).

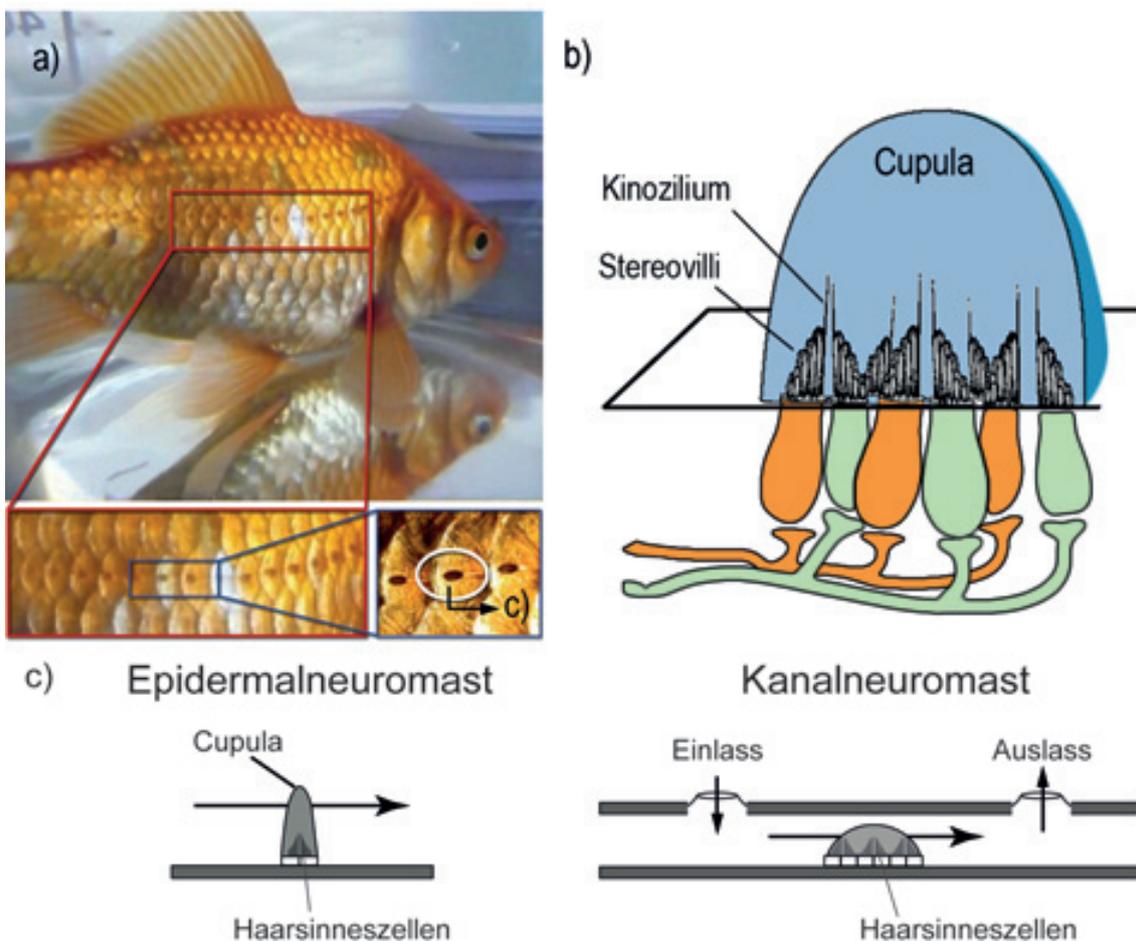


Abbildung 1: Neuromasten bei Fischen. a. Goldfisch (*Carassius auratus*) mit Poren des Rumpfseitenlinienkanals. b. Anordnung der Haarsinneszellen in einem Sinnesepithel eines Neuromastens und deren Anbindung an das Nervensystem. c. Schematische Darstellung der beiden verschiedenen Neuromasten. Links ist der Epidermalneuromast gezeigt, bei dem die *Cupula* einen direkten Kontakt mit dem umgebenden Wasser hat. Rechts ist der Kanalneuromast dargestellt, der in diesem Projekt als Vorbild dient.

Durch Verschiebung der *Cupula* werden die Stereovillibündel ausgelenkt. Die Auslenkung führt zu einer Veränderung des Membranpotentials der Haarsinneszellen. Die Veränderung des Membranpotentials ist proportional zur Auslenkung des Stereovillibündels. Die Sensoren sind hochsensibel: Die kleinste Auslenkung, die erkannt wird - also die Schwellenempfindlichkeit - liegt bei nur $0,01^\circ$.

Jede Wasserbewegung verschiebt die *Cupula* eines Neuromasten - relativ zu dem darunter liegenden Sinnesepithel - im Bereich weniger Ångström. Bei gleicher Strömungsgeschwindigkeit lösen Wasserfluktuationen entlang der Längsachse der *Cupula* eine maximale Antwort aus; dagegen führen Fluktuationen senkrecht zur Längsachse der *Cupula* zu keiner oder nur zu einer kleinen Antwort. Auf diese Weise kann der Fisch Wasserfluktuationen genau orten. Dieses ausgefeilte biologische System der Fische nehmen wir uns zum Vorbild.

Der Natur abgeschaut und nachgebaut

Wir entwickeln - gefördert vom BMBF und in Zusammenarbeit mit Professor Bleckmann vom Institut für Zoologie der Universität Bonn und der Firma Hydrometer in Ansbach - einen mikrobionischen Strömungssensor. Als Vorbild für den Strömungssensor dienen uns die Kanalneuromasten der Fische: Auch unser technologischer Sensor besitzt auf seiner Oberfläche so etwas wie „Härchen“ - sogenannte Lamellen. Die Lamellen befinden sich in einem Strömungskanal (Abbildung 2). Durch die Strömung werden die Lamellen ausgelenkt. Die Auslenkung kann auf unterschiedliche Art - optisch oder elektrisch - detektiert werden. Bei laminarer Strömung werden die Lamellen konstant ausgelenkt - der Sensor bleibt ruhig. Fluktuationen in der

Strömung hingegen führen zu einer Vibration der Lamelle; diese Vibration löst ein Messsignal aus.

Wie kann man mit Hilfe solcher Signale die Strömungsgeschwindigkeit ermitteln? Die Idee ist naheliegend: Wir erzeugen künstliche Wirbel in der Strömung. Diese Wirbel führen zu Fluktuationen, die sich im Strömungskanal ausbreiten und an zwei aufeinanderfolgenden Lamellen detektiert werden. Aus der zeitlichen Differenz der Messsignale und dem bekannten Abstand der Lamellen kann man die Strömungsgeschwindigkeit berechnen.

Es bleibt die - aus technologischer Sicht spannende - Frage offen, wie man die Auslenkung der Lamellen misst. Elektrische Messverfahren beruhen auf zwei Ansätzen: einem kapazitiven und einem piezoresistiven Ansatz. Gemein ist beiden Ansätzen das Grundprinzip: Die Lamelle ist mit einer Membran fest verbunden, so dass die Membran durch die Auslenkung der Lamelle verformt wird. Diese Verformung der Membran führt zu einer Änderung des elektrischen Messsignals. Beim kapazitiven Ansatz ist die Membran Teil eines Mikro-Plattenkondensators. Durch die Verformung der Membran ändert sich die Kapazität des Kondensators. Beim piezoresistiven Ansatz arbeitet man mit sogenannten Wheatston'schen Brücken; man misst elektrische Änderungen der in einer Membran integrierten Widerstände, die durch die Verformung auftreten. Vielversprechende Ansätze - aber führen diese auch zum Ziel? Noch liegen keine Simulationsrechnungen für elektrische Messverfahren vor. Anders sieht es bei optischen Messverfahren aus: Hier gibt es bereits erfolgreiche, makroskopische Vorarbeiten von Professor Bleckmann. Aus diesem Grund haben wir uns zunächst auf optische Messverfahren konzentriert. Diese stellen wir im Folgenden genauer vor.

Messen mit Licht

Das Prinzip des optischen Messverfahrens ist einfach zu verstehen: Durch optisch transparente Lamellen wird Licht geleitet. Das Licht trifft auf eine 2-Quadrantendiode. Eine Quadrantendiode ist in mehrere Fotodioden unterteilt. Die Fotodioden wandeln Licht in elektrischen Strom um und erlauben so eine Messung der eingestrahlt Lichtintensität. Wir verwenden eine 2-Quadrantendiode; diese besteht - wie der Name andeutet - aus zwei Fotodioden. Durch Fluktuationen in der Strömung werden die Lamellen ausgelenkt. Dadurch ändert sich die Lichtintensität auf den beiden Fotodioden der 2-Quadrantendiode (siehe Abbildung 2).

Mikrobionische Werkstatt

Der Herstellungsprozess ist komplex und

zeitintensiv. Fotolithographie-, Oxidations-, Ätz- und Beschichtungsschritte wechseln sich ab. Abbildung 3 beschreibt den Ablauf in vereinfachter Form.

Die Lamellen bestehen aus Polydimethylsiloxan (PDMS). Sie werden durch Mikroabformen aus geätzten Silizium-Kavitäten hergestellt. Was heißt das genau? In einen Silizium-Wafer wird trockenchemisch ein Hohlraum (Kavität) geätzt - die „Negativform“ der Lamelle. Dieser Hohlraum wird mit PDMS gefüllt (Abbildung 3, Prozessstufen 3 und 6). Das von uns gewählte Verfahren - eine Mikroabformung von geätzten Mikrokapititäten - ist etwas unkonventionell. Erste Ergebnisse bestätigen jedoch, dass diese Vorgehensweise erfolgversprechend ist: Die Erfolgsquote ist gut und die Strukturen werden exakt abgebildet. Die Strömungskanäle, in die die

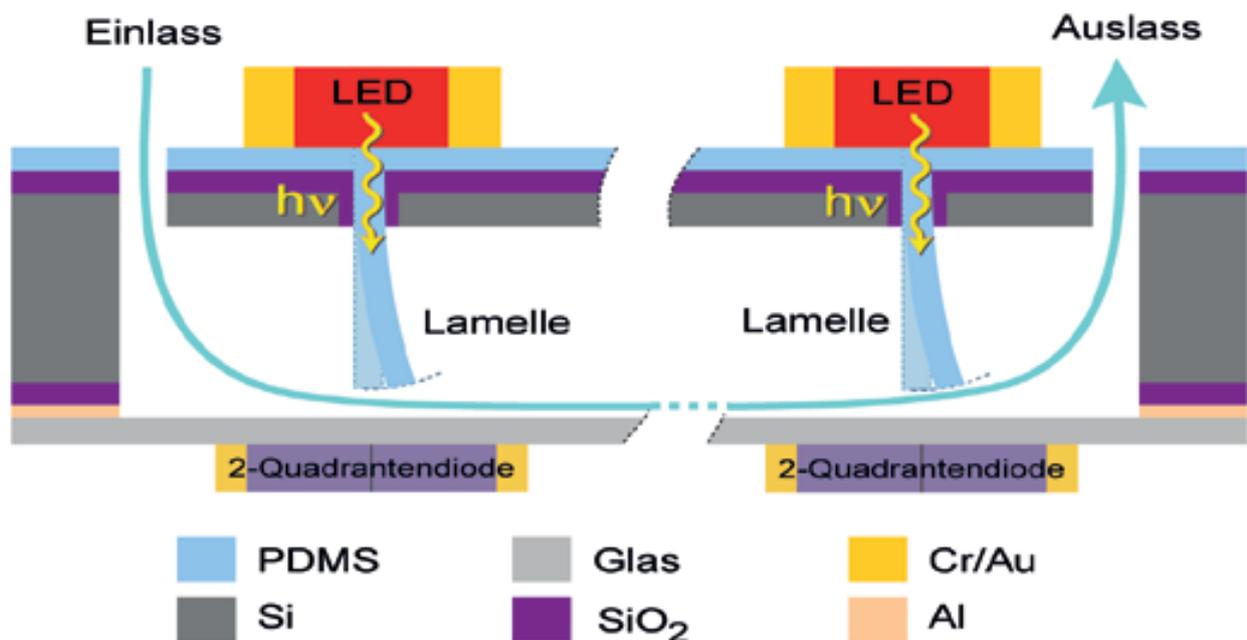


Abbildung 2: Das technologische Prinzip des optischen Strömungssensors. Durch künstliche Wirbel werden Fluktuationen in der Strömung verursacht. Diese Fluktuationen versetzen die Lamellen in Vibration. Durch die Vibration wird die Lichtintensität auf den beiden Fotodioden der 2-Quadrantendiode verändert. Die Laufzeit eines Fluktuationssignals zwischen den beiden Lamellen kann gemessen und daraus die Strömungsgeschwindigkeit errechnet werden. Zu erkennen sind die verwendeten Materialien, die LEDs und die Flussrichtung im Kanal.

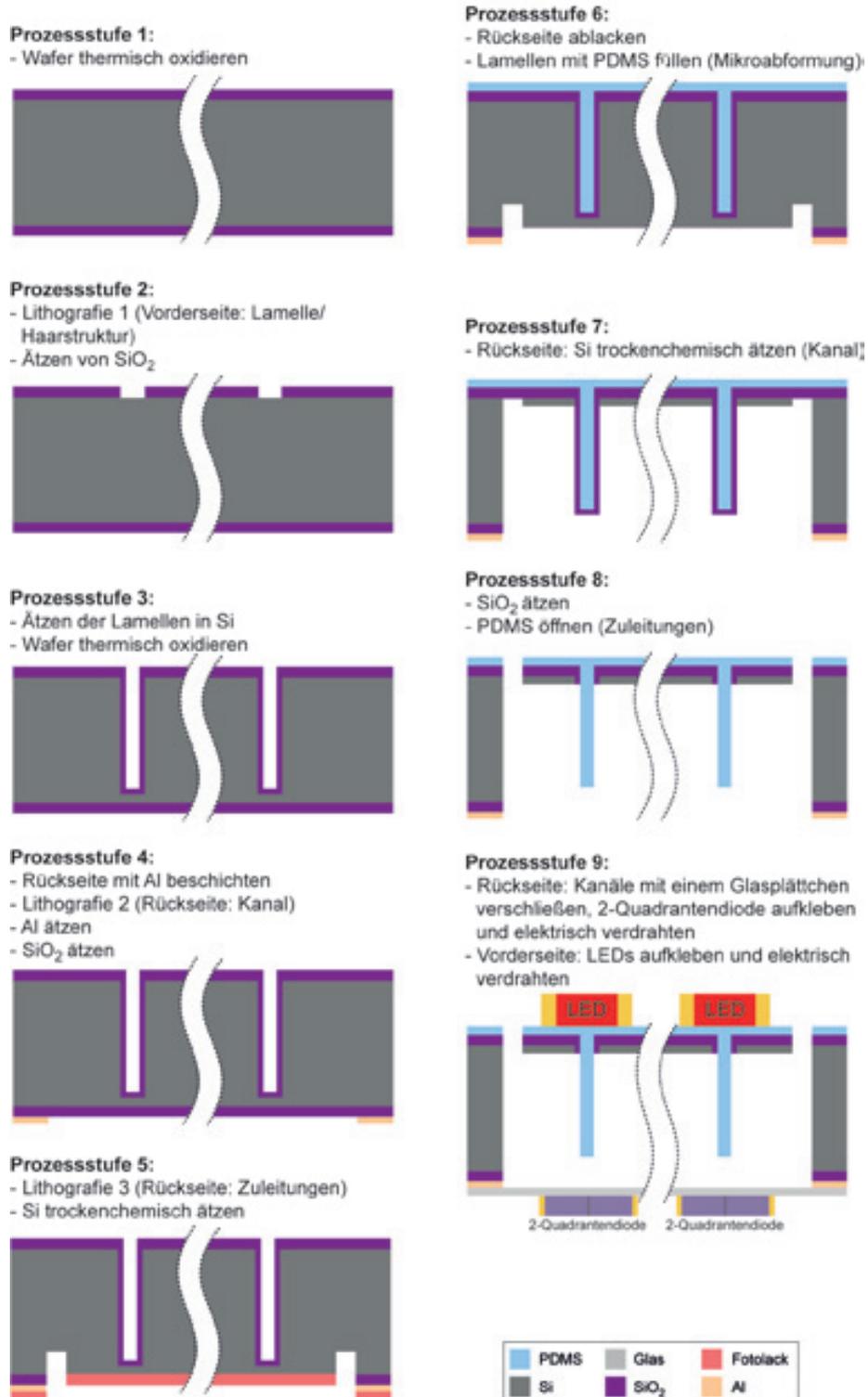


Abbildung 3: Schematische Querschnittsbilder des Herstellungsprozesses. Der Prozess ist vereinfacht dargestellt. Die Beschichtungen werden mit Sputterverfahren durchgeführt, die Ätzungen mit trocken- und nasschemischem Verfahren.

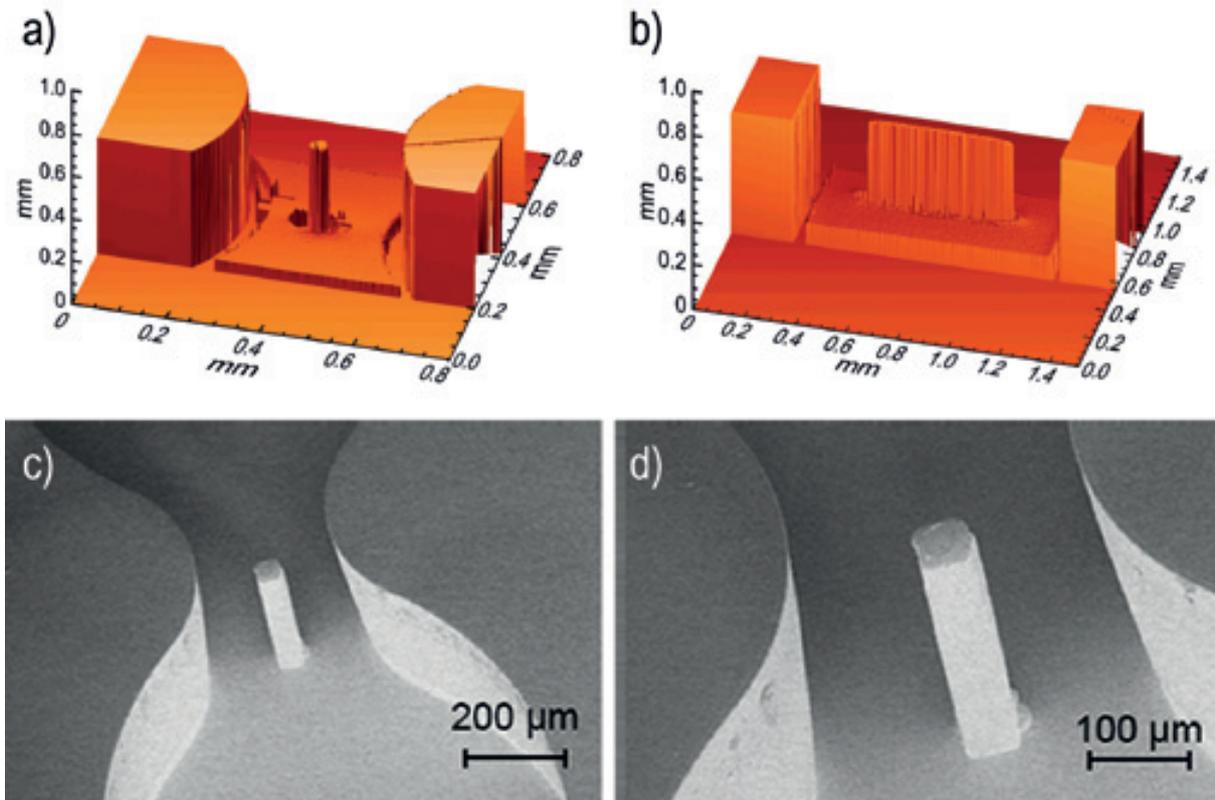


Abbildung 4: Profilmeteraufnahmen von zwei PDMS-Lamellen. **a.** Die kleinere Lamelle von $50 \times 50 \mu\text{m}^2$ befindet sich in einer Kanalverengung von $300 \mu\text{m}$. **b.** Die größere Lamelle mit Abmessungen von $50 \times 600 \mu\text{m}^2$ ist in einen Kanal von $1000 \mu\text{m}$ Breite integriert. Die Lamellenhöhe beträgt in beiden Fällen ca. $500 \mu\text{m}$. **c. und d.** Rasterelektronenmikroskopaufnahmen der PDMS-Lamelle ($50 \times 50 \mu\text{m}^2$) im Strömungskanal.

Haarstrukturen integriert sind, werden ebenfalls trockenchemisch geätzt.

Die Abbildungen 4a und 4b zeigen Profilmeteraufnahmen von zwei PDMS-Lamellen im Strömungskanal mit unterschiedlichen Querschnitten. Die kleinere Lamelle wird zusätzlich in zwei Rasterelektronenmikroskop-Aufnahmen (Abbildungen 4c und 4d) gezeigt. Wir haben die Oberflächenrauigkeit der Lamellen inzwischen auf weniger als 30 nm verringert. Diese geringe Oberflächenrauigkeit ist wichtig, damit das Licht an der Lichtleiteroberfläche nicht streut. Vor dem Ätzen des Strömungskanals müssen die PDMS-Lamellen geschützt werden (Abbildung 3, Prozessstufe 7).

Dieser Schutz kann durch thermisches Oxidieren des Silizium-Wafers erreicht werden: die empfindliche Lamelle wird so in Siliziumdioxid „eingepackt“. Nach dem Ätzvorgang wird die Siliziumdioxid-Schutzschicht mit einer von uns entwickelten nasschemischen Technik schonend entfernt - ohne dass die Lamelle angegriffen wird (Prozessstufe 8).

Der mikrotechnologische Strömungssensor muss nun durch ein „Interface“ mit der makroskopischen Umwelt verbunden werden. Ein solches Interface haben wir aus Polymethylmethacrylat (PMMA) hergestellt. Abbildung 5 zeigt die Kanalstrukturen, links ohne den optischen Strömungssensor, rechts mit dem Sensor.

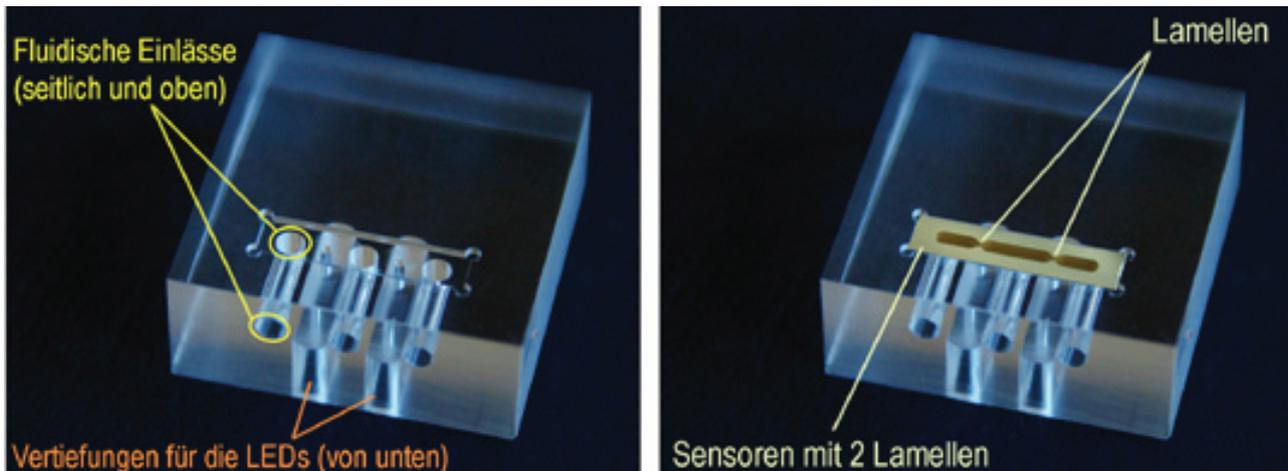


Abbildung 5: Kanalstrukturen in Polymethylmethacrylat (PMMA). a. Darstellung ohne Strömungssensor b. Darstellung mit Strömungssensor. Zu sehen ist eine Kanalstruktur mit drei Zugängen. Lässt man die Flüssigkeit aus dem mittleren Zugang heraustreten, kann man das Verhalten einer einzelnen Lamelle studieren. Überbrückt man den mittleren Zugang, kann man ein System mit zwei Lamellen untersuchen und die Flussgeschwindigkeit messen.

Ist noch alles dicht?

Ein Ziel der Mikrobionik ist die Entwicklung bionischer Sensoren, bei der - neben den wissenschaftlichen Erkenntnissen - auch die Anwendbarkeit und Möglichkeit einer kostengünstigen Produktion beachtet wird. Dies ist auch bei unserem Projekt der Fall: der Sensor soll eingesetzt werden, Strömungsgeschwindigkeiten in Wasserleitungen zu messen. Änderungen in der Strömungsgeschwindigkeit können auf Leckagen im Trinkwassersystem hindeuten. Diese Leckagen verursachen einen Wasserverlust von bis zu 40%. Mit anderen Worten: Fische könnten helfen unsere Trinkwasser-Ressourcen besser zu nutzen!

Auch Rückwirkungen auf die biologische Grundlagenforschung sind denkbar: Möglicherweise können die mit Hilfe des Strömungssensors gewonnenen Erkenntnisse dazu beitragen, das natürliche Vorbild besser zu verstehen.

Ein weiteres Projekt der Mikrobionik ist die Entwicklung eines im caesar-Jahresbericht 2008

vorgestellten Infrarotsensors, der für eine effiziente und kostengünstige Waldbrandüberwachung sorgen kann. Für beide bionische Mikrosensoren liegen bereits weltweit Anfragen von praktischen Anwendern und wissenschaftlichen Entwicklern vor.

Referenzen

- [1] Klein, A. and Bleckmann, H. (2011) "Determination of object position, vortex shedding frequency and flow velocity using artificial lateral line canals" *Beilstein J. Nanotechnol.* 2, 276-283
- [2] Klein, A., Herzog, H., and Bleckmann, H. (2011) "Lateral line canal morphology and signal to noise ration" *Proc. SPIE* 7875, 797507

caesar



center of advanced
european studies
and research

**Berichte über
abgeschlossene Doktorarbeiten**

caesar



center of advanced
european studies
and research

Wie Proteinstrukturen das Laufen lernen

SEBASTIAN PEUKER

Molekulare Neurosensorik

Unser Verständnis der Funktionsweise von Proteinen ist geprägt von den beeindruckenden Bildern, die mit Hilfe moderner Röntgenkristallographie und NMR-Spektroskopie erarbeitet werden. Proteinstrukturen können mit diesen Methoden bis zum letzten Atom räumlich dargestellt werden. Die Strukturen sind bisweilen atemberaubend. In jüngster Zeit wird aber mehr und mehr klar, dass die Funktion eines Proteins weitgehend durch seine dynamischen Eigenschaften bestimmt wird. Das große Ziel ist, Proteine bei der Arbeit in Echtzeit zu beobachten. Wir brauchen also Techniken, die es erlauben den strukturgebenden Methoden eine vierte Dimension hinzuzufügen – die Zeit. Bisher konnte man Proteinzustände oft nur im Gleichgewicht beobachten. Ich wollte im Rahmen meiner Doktorarbeit das Repertoire verfügbarer Techniken auf ligandenbindende Proteine ausweiten (siehe Jahresbericht 2009: Ultraschnelles Einfrieren eines Aktivierungsprozesses - Eine Diashow molekularer Bewegung). Als Modellprotein habe ich eine Bindestelle für zyklische Nukleotide ausgewählt. Zyklische Nukleotide zählen zu den wichtigsten Botenstoffen in einer Zelle. Die Konzentration dieser Botenstoffe in der Zelle wird sehr genau kontrolliert und mehr als zwei Drittel unserer Rezeptoren verändern über die Aktivierung von Signalkaskaden die Konzentration dieser Botenstoffe. Im Inneren der Zelle gibt es spezifische Zielproteine, die Bindestellen für cAMP besitzen. Wenn cAMP bindet, verändern die Zielproteine ihre räumliche Struktur; sie gehen von einem inaktiven in einen aktiven Zustand über. Das Ziel meiner Arbeit war mit möglichst hoher Auflösung zu verfolgen, wie sich die Struktur der Proteine bei der Bindung von cAMP ändert und über Zwischenschritte vom inaktiven zum aktiven Zustand überführt wird.

Ich wollte also die Dynamik der Strukturänderung einer cAMP-Bindestellen (CNBD) untersuchen. Aus früheren Untersuchungen wusste ich bereits, dass die CNBD ohne Ligand in einem einzigen Zustand vorliegt, dem sogenannten Grundzustand (Abbildung 1). Fügt man nun den Liganden hinzu, bildet dieser mit der CNBD zunächst einen losen Komplex, den man auch *encounter complex* nennt. Noch liegt die CNBD im Grundzustand vor. In sehr kurzer Zeit, vermutlich in wenigen Mikrosekunden, lagert sich der *encounter*

complex aber in den aktivierten Zustand um. Wie die Umlagerung erfolgt, ist völlig unklar. Es war mein Ziel, diese Fragestellung zu untersuchen.

Für solche Untersuchungen existiert zurzeit keine Methode. Was muss die Methode eigentlich leisten? Im ersten Schritt müssen die CNBD und der Ligand sehr schnell miteinander gemischt werden – länger als ein paar Mikrosekunden darf das nicht dauern. Danach muss die Strukturänderung sowohl mit sehr hoher zeitlicher als auch mit großer räumlicher

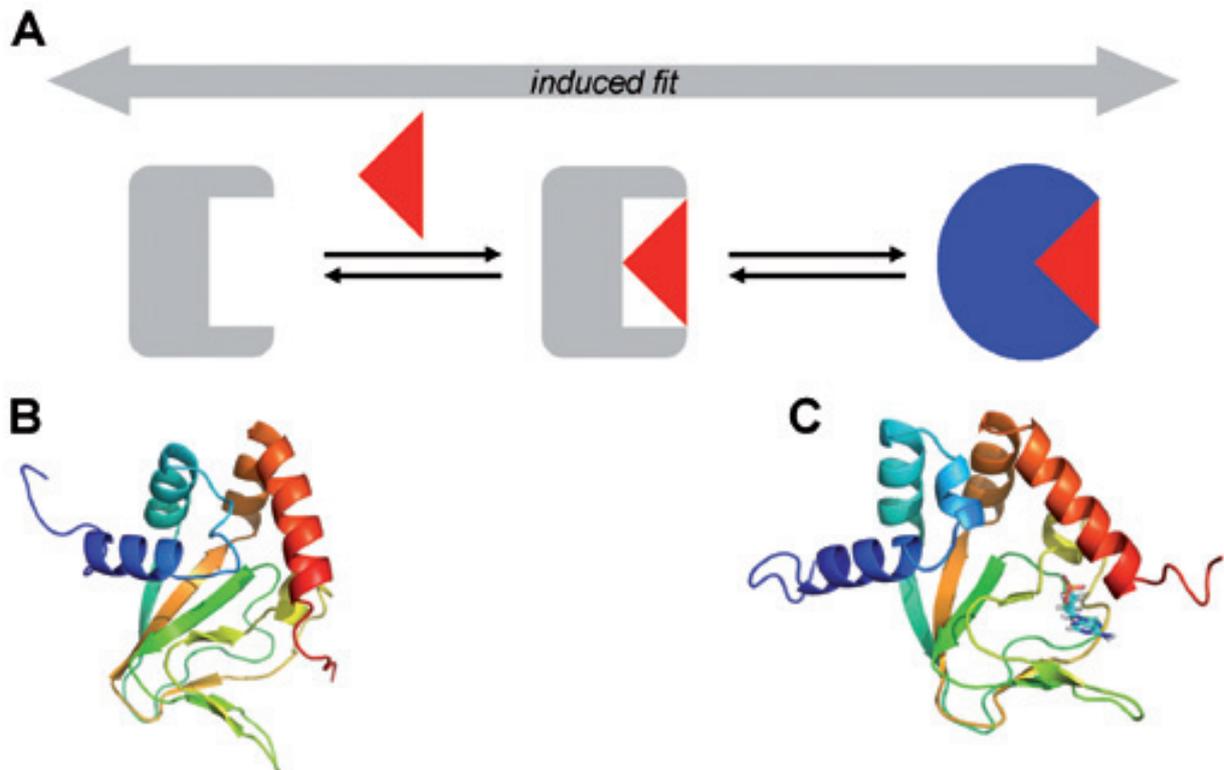


Abbildung 1: Schema der strukturellen Umlagerung in der CNBD nach dem sogenannten „*induced fit*“-Mechanismus. A. Der Grundzustand ist hier in grau dargestellt. Bindet der Ligand cAMP (rotes Dreieck), so bildet sich der *encounter complex*. Dieser isomerisiert dann in den aktivierten Zustand (blau). B. Hochoaufgelöstes dreidimensionales Modell der CNBD im Grundzustand (PDB code: 2KXL). C. Hochoaufgelöstes dreidimensionales Modell der CNBD im aktivierten Zustand (PDB code: 2K0G). Beide Strukturen wurden mit Hilfe der NMR-Spektroskopie bestimmt.

Auflösung verfolgt werden. Bisher konnte man Proteine entweder mit hoher zeitlicher oder mit hoher räumlicher Auflösung beobachten. Durch die Kombination von zwei Techniken wollte ich nun beides auf einmal erreichen. In einem ersten Schritt sollte die Probe mit einer sogenannten „*microsecond freeze-hyper quenching*“-Anlage (MHQ-Anlage, Abbildung 2 A) vorbereitet werden. Mit der MHQ-Anlage kann man zwei Lösungen, hier Protein und Ligand, in wenigen Nanosekunden miteinander mischen. Unmittelbar danach wird die gemischte Lösung eingefroren. Der Einfrierprozess verläuft so schnell, dass alle Bewegungen, auch die des Proteins, sofort erstarren. Da die Zeit zwischen dem Mischen und dem Einfrieren variiert werden kann, ist

es möglich, Proben mit unterschiedlichem „Alter“ zu präparieren. Die eingefrorenen Proben können nun in aller Ruhe untersucht werden. Doch wie kann ich die räumliche Änderung der Struktur beobachten? Leider ist es nicht möglich, die CNBD mit atomarer Auflösung im gefrorenen Zustand zu beobachten. Allerdings kann man spezielle Sonden, sogenannte *spin labels*, in das Protein einbauen und den Abstand dieser Sonden messen (Abbildung 2 B). Die so bestimmten Abstände können dann auf die hochauflösenden, atomaren Strukturen vom Grundzustand bzw. aktivierten Zustand (vgl. Abbildung 1 B und C) projiziert werden. Der Plan besteht darin, ein ganzes Netz von Abständen in der CNBD auszumessen, um die Umlagerung in jeder Region der CNBD genau

beobachten zu können.

So weit also eine Zusammenfassung meines experimentellen Konzepts. Vor gut einem Jahr konnte ich zusammen mit Professor Simon de Vries (TU Delft) den Nachbau der schnellste MHQ-Anlage der Welt fertig stellen. Außerdem hatte ich die Kinetik der Ligandenbindung vollständig untersucht und Stellen in der CNBD identifiziert, mit deren Hilfe ich die Strukturänderungen in dem Protein beobachten wollte. Was ist im letzten Jahr passiert? Zwei Dinge mussten noch gelingen, damit ich mit den eigentlichen Messungen beginnen konnte: Zum einen musste ich die MHQ-Anlage kalibrieren und

zum anderen chemisch reine CNBD herstellen, die an den ausgesuchten Stellen die *spin labels* tragen.

Beide Aufgaben sind nicht leicht, doch fangen wir von vorne an – dem Kalibrieren der MHQ-Anlage. Dabei geht es darum zu prüfen, ob das eingestellte und damit erwartete „Probenalter“ einer eingefrorenen Probe tatsächlich stimmt. Für die Kalibrierung habe ich eine chemische Reaktion verwendet, deren Geschwindigkeit genau bekannt ist und die im Mikrosekunden-Bereich abläuft. Ich habe die Oxidation von Oxymyoglobin durch Stickstoffmonoxid zu Metmyoglobin verwendet. Oxymyoglobin ist der Farbstoff, der frischem Fleisch seine rötliche Farbe

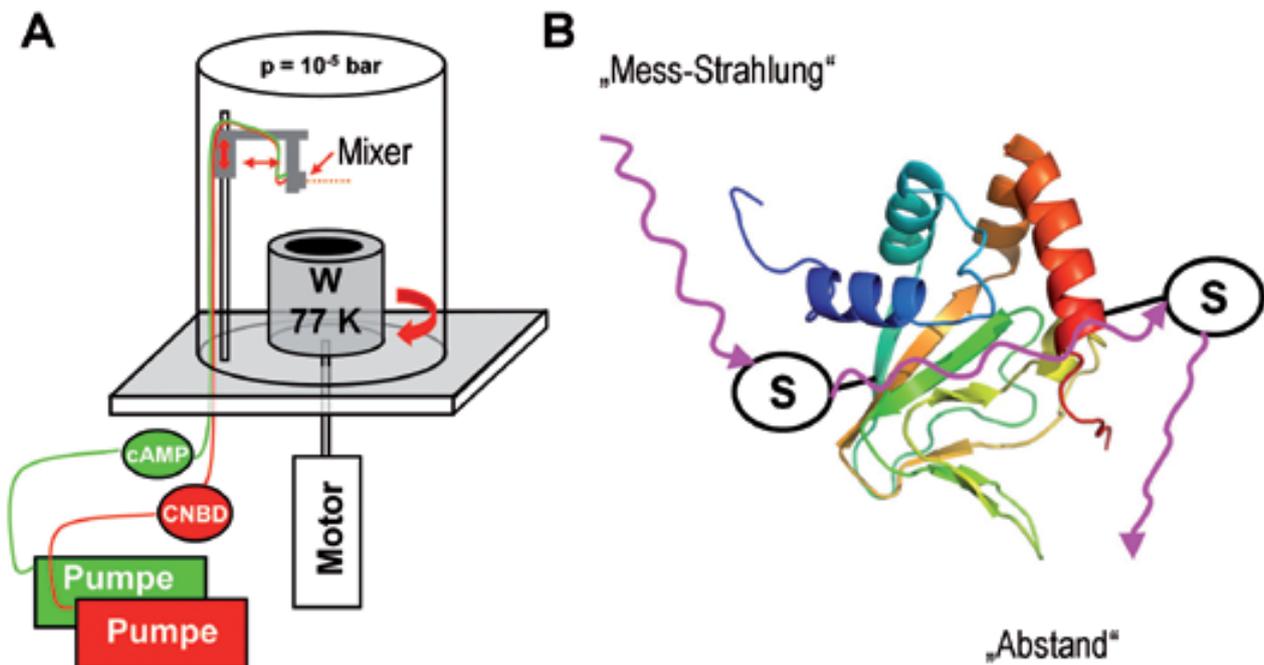


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Messprinzips. A. Mit der MHQ-Anlage werden die Proben für die Abstandsmessungen vorbereitet. Zwei HPLC-Pumpen versorgen den Mixer mit der Protein- (CNBD) und Ligandenlösung (cAMP). Ein Jet der gemischten Lösung tritt mit bis zu 400 m/s aus der Mischkammer aus. Der Mixer wird in den rotierenden, -196 °C kalten Metallzylinder abgesenkt und die Probe auf die kalte Metalloberfläche gesprüht. Sie friert sofort ein. B. Prinzip der Abstandsmessung. Die doppelt-markierte CNBD wird in ein starkes Magnetfeld eingebracht (hier nicht dargestellt). Dann wird die Probe einer speziellen Mess-Strahlung ausgesetzt und der Übertrag dieser Strahlung von der einen auf die andere Sonde wird beobachtet. Daraus lässt sich der Abstand der beiden Sonden bestimmen.

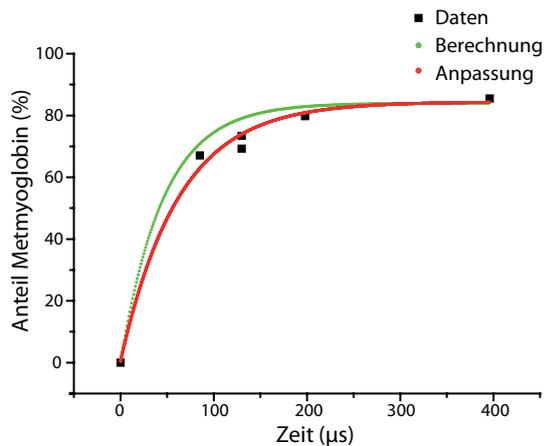


Abbildung 3: Kalibrierung der MHQ-Anlage. Wie im Text beschrieben, habe ich zur Kalibrierung der MHQ-Anlage die Oxidation des Oxy-myoglobin verwendet. Dabei entsteht Metmyoglobin. Die Reaktion habe ich zu verschiedenen Zeitpunkten abgestoppt und den Reaktionsfortschritt beobachtet, d. h. durch Messungen der Absorption den Anteil an Metmyoglobin bestimmt. Aus dem Vergleich der so bestimmten Daten mit der bekannten Reaktionsgeschwindigkeit kann ich schließen, dass unsere MHQ-Anlage einen dynamischen Bereich von 80 μs bis 20 ms hat.

gibt. Durch die Oxidation wird die Absorption von Licht auf charakteristische Weise verändert. Eine ähnliche Reaktion hat jeder schon beobachtet: ein frisches Stück Fleisch ist eher dunkelrot; die Oxidation des Oxy-myoglobin durch den Luftsauerstoff führt aber zu einer Veränderung der Farbe, es wird gräulich-braun. Der Ablauf der Reaktion kann also an einem Farbumschlag („Indikator“) abgelesen werden. In Abbildung 3 habe ich das Ergebnis der Kalibrierung dargestellt. Man erkennt, dass die experimentellen Daten gut mit dem theoretisch vorhergesagten Verlauf übereinstimmen. Unsere MHQ-Anlage arbeitet wie erhofft; sie besitzt einen dynamischen Bereich von 80 μs bis 20 ms.

Nun benötige ich also nur noch reine, doppelt-markierte CNBD und die Untersuchung der Proteindynamik kann beginnen. Klingt einfach, ist es aber nicht. Ich wollte die Sonden gezielt an bestimmten Stellen in die

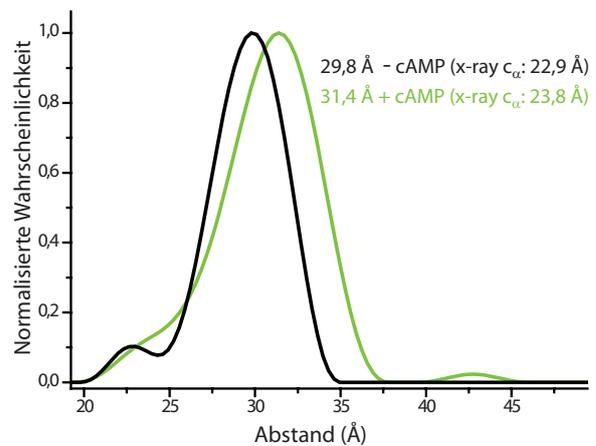


Abbildung 4: Eine erste Abstandsmessung innerhalb der CNBD. Trotz der großen Schwierigkeiten bei der Herstellung doppelt markierter CNBDs gelang es mir, einen ersten Abstand innerhalb des Proteins auszumessen. Dieser ist in guter Übereinstimmung mit den hochaufgelösten Strukturen. Dass der absolute Abstand der *spin labels* etwa 7 Å größer ist als der der Aminosäuren im Wildtyp, war zu erwarten, da die Gruppen unterschiedliche Ausdehnungen haben. Die Änderung des Abstandes durch die Zugabe des Liganden ist sehr ähnlich.

CNBD einbauen, damit ich ein Netz aus Abständen bestimmen kann. Grundsätzlich ist das Vorgehen immer gleich: Man benötigt an der gewünschten Stelle im Protein eine spezielle chemische Gruppe, die sich spezifisch mit der Sonde modifizieren lässt. Unter den 20 natürlichen Aminosäuren bietet das sogenannte Cystein, eine schwefelhaltige Aminosäure, genau diese Eigenschaft. Ich habe verschiedene CNBDs hergestellt, die an den gewünschten Stellen Paare von Cysteinen tragen. Diese mussten nur noch modifiziert werden. Leider sollte genau dieser Schritt wesentlich komplizierter werden, als wir ahnten. Im Normalfall nimmt man einfach das gereinigte Protein, behandelt es mit einem speziellen Markierungsreagenz und baut so unkompliziert die Sonde in das Protein ein. Die CNBD, die ich in meiner Arbeit untersuchen wollte, wurde allerdings durch die Reaktion mit dem Markierungsreagenz „entfaltet“. Erst durch eine aufwendige Behandlung und unter großen Verlusten in der Ausbeute, gelang es mir,

doppelt markierte CNBD herzustellen. Eine erste Abstandsuntersuchung dieser Probe war erfolgreich. Die beobachteten Abstände innerhalb der CNBD in der Ausgangs- und Endkonfiguration stimmen exzellent mit der dreidimensionalen Strukturen dieser Zustände überein (Abbildung 4).

Wenn es mir nun gelingt das Markierungsprotokoll so zu optimieren, dass ich ausreichende Mengen markierter CNBD herstellen kann, steht der Untersuchung zur Dynamik nichts mehr im Wege. Ich hoffe auch noch die letzten Schwierigkeiten zu überwinden. Wir dürfen auf die Ergebnisse weiter gespannt sein.

Referenzen

[1] Cukkemane, A., Seifert, R., and Kaupp, U.B. (2010) "Cooperative and uncooperative cyclic-nucleotide-gated ion channels" *Trends Biochem. Sci.* 36, 55-64

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

[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] 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

[5] Schünke, S., Soldt, M., Lecher, J., Kaupp, U.B., and Willbold, D. (2011) "Structural insights into

conformational changes of a cyclic nucleotide-binding domain in solution from *Mesorhizobium loti* K1 channel" *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 6121-6126

[6] 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

[7] Klare, J.P. and Steinhoff, H.J. (2010) "Site-directed Spin Labeling and Pulse Dipolar Electron Paramagnetic Resonance": *Encyclopedia of Analytical Chemistry*

[8] Herold, S., Exner, M., and Nauser, T. (2001) "Kinetic and mechanistic studies of the NO*-mediated oxidation of oxymyoglobin and oxyhemoglobin" *Biochemistry* 40, 3385-3395



Sebastian Peuker hat Chemie an der Universität zu Köln studiert. Im August 2007 hat er sein Diplom für seine Arbeit zur Bindungskinetik zyklisch Nukleotid-gesteuerter Ionenkanäle am Forschungszentrum Jülich erhalten. Dieses Projekt war der Ausgangspunkt für seine Doktorarbeit bei Herrn Prof. Dr. U. B. Kaupp – zunächst im Forschungszentrum Jülich, später im Forschungszentrum caesar. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. S. de Vries hat er den Bau der MHQ-Anlage betreut und koordiniert. Im Februar 2011 hat er seinen Dokortitel erhalten. Seit März 2011 ist er im Forschungszentrum caesar als wissenschaftlicher Mitarbeiter tätig.

caesar



center of advanced
european studies
and research

Vom Monomer zum Tetramer - Gemeinsam sind wir stärker

FRIEDERIKE WINKHAUS
Molekulare Neurosensorik

Wir alle wissen: Der Herzschlag sichert unser Überleben. Die Entstehung und Regulation des Herzschlags verdanken wir verschiedenen Ionenkanälen. Wichtige Taktgeber sind die sogenannten HCN-Kanäle oder auch Schrittmacherkanäle. Auf Grund ihrer besonderen physiologischen Funktion ist es wichtig, die Eigenschaften und die Regulation der HCN-Kanäle genau zu verstehen.

Ionenkanäle sind winzige Schleusen in der Zellmembran, die als Antwort auf bestimmte Signale öffnen oder schließen. Sind die Ionenkanäle geöffnet, können Ionen die undurchdringliche Zellmembran passieren. Ionenkanäle unterscheiden sich in ihrer Ionenselektivität, also in der Auswahl der Ionen, die sie leiten, sowie in ihrem Aktivierungsmechanismus. HCN-Kanäle (*hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated channels*), mit denen ich mich in meiner Doktorarbeit beschäftigt habe, besitzen ganz ungewöhnliche Eigenschaften: HCN-Kanäle werden aktiviert, wenn das Membranpotenzial negativer wird, wir sprechen dann von einer Hyperpolarisation, während die meisten anderen Ionenkanäle aktiviert werden, wenn das Membranpotenzial positiver wird, also eine Depolarisation stattfindet. Die Aktivität der HCN-Kanäle wird außerdem durch die Bindung intrazellulärer Liganden, sogenannte zyklische Nukleotide, reguliert. Hierzu gehören das zyklische Adenosin-Monophosphat (cAMP) und das zyklische Guanosin-Monophosphat (cGMP).

In Säugetieren gibt es vier verschiedene HCN-Kanalisoformen – HCN1-HCN4. HCN-Kanäle

bilden Tetramere, d.h. sie bestehen aus vier Untereinheiten, die sich um eine zentrale Pore anordnen (Abbildung 1). Jede Untereinheit besteht aus einem Transmembranbereich und einer intrazellulär gelegenen Bindestelle für zyklische Nukleotide (*cyclic nucleotide-binding domain*, CNBD). Der sogenannte C-Linker verbindet die CNBD mit dem Transmembranbereich, der die Pore beherbergt [1].

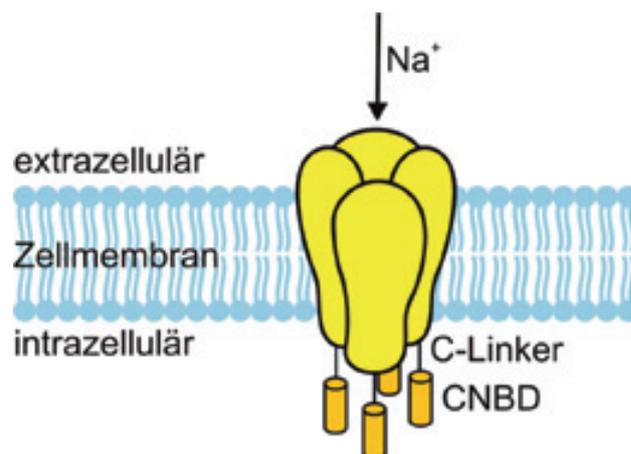


Abbildung 1: Tetramerer Aufbau der HCN-Kanäle. In HCN-Kanälen lagern sich vier Untereinheiten um eine zentrale Pore zusammen. Jede Untereinheit besteht aus einem Transmembranbereich und der intrazellulär gelegenen CNBD. Der C-Linker verbindet die CNBD mit dem Transmembranbereich.

Die CNBD ist wichtig für die Funktion der HCN-Kanäle, da sie den Aktivierungszustand der Kanäle kontrolliert: HCN-Kanäle können in einer offenen und einer geschlossenen Konformation vorliegen. Wenn cAMP oder cGMP an die CNBD binden, ändert sich die Offenwahrscheinlichkeit der Kanalpore.

Wie aber wird die Ligandenbindung auf die Pore übertragen? Um diese Frage zu beantworten, müssen wir zunächst die Ligandenbindung an sich verstehen. Was passiert, nachdem der Ligand gebunden hat? Untersuchungen am isolierten C-Terminus (von nun an „CNBD-Protein“ genannt), der aus dem C-Linker und der CNBD besteht, bieten eine gute Möglichkeit, die Ligandenbindung unabhängig von den spannungsgesteuerten Prozessen zu untersuchen. Erste Versuche wurden am isolierten CNBD-Protein des HCN2-Kanals aus der Maus durchgeführt [2]. Zagotta und Kollegen lösten die dreidimensionale Struktur dieses Proteins in der cAMP-gebundenen Form und konnten somit wichtige Wechselwirkungen des Proteins mit dem zyklischen Nukleotid beschreiben. Darüber hinaus machten sie eine weitere spannende Beobachtung: In Abwesenheit zyklischer Nukleotide liegt das CNBD-Protein überwiegend als Monomer vor. In Anwesenheit von cAMP bildet das isolierte CNBD-Protein – genau wie der ganze Kanal – ein Tetramer. Diese tetramere Anordnung scheint für die Modulation der HCN-Kanäle durch zyklische Nukleotide äußerst wichtig zu sein.

Ich habe in meiner Doktorarbeit diese Oligomerisierung – die Zusammenlagerung mehrerer Untereinheiten zu einem Komplex – des CNBD-Proteins von HCN2 genauer untersucht: Wirkt sich die Oligomerisierung auch auf die Bindung zyklischer Nukleotide aus? Gibt es also ein Wechselspiel zwischen Bindung und Oligomerisierung? Und wie lange bleiben die zyklischen Nukleotide am Protein

gebunden? Gibt es Unterschiede zwischen den verschiedenen oligomeren Zuständen?

Erste Experimente, die in unserer Arbeitsgruppe von Dr. Cukkemane durchgeführt wurden, haben gezeigt, dass das CNBD-Protein – wie von Zagotta und Kollegen postuliert – tatsächlich in Anwesenheit von cAMP oligomerisiert. Allerdings dauert es, aus der Sicht eines Biologen, relativ lange (30-40 Minuten), bis sich die Oligomere gebildet haben. Ich habe mich gefragt, ob die verschiedenen oligomeren Zustände unterschiedliche Ligandenbindungseigenschaften haben. Die Verweildauer eines Liganden am Protein beschreibt die sogenannte „*off*-Rate“, die angibt, wie schnell ein Protein-Ligand-Komplex wieder in seine Bestandteile zerfällt. Um die „*off*-Rate“ von cAMP bestimmen zu können, musste ich in die wissenschaftliche Trickkiste greifen: Ich habe ein modifiziertes cAMP-Molekül verwendet – das 8-NBD-cAMP [3]. Die NBD-Gruppe ist ein Umgebungssensor, der anzeigt, ob sich das 8-NBD-cAMP frei in Lösung befindet (wenig fluoresziert) oder an das CNBD-Protein gebunden ist (stark fluoresziert) (Abbildung 2A). Nun brauchte ich noch eine geeignete Technik, um die „*off*-Rate“ zeitaufgelöst verfolgen zu können. Hierzu habe ich eine schnelle Mischtechnik, die sogenannte „*Stopped Flow*-Technik“ verwendet. Diese Methode ermöglicht es, zwei Lösungen sehr schnell miteinander zu mischen und den Reaktionsverlauf anschließend zeitaufgelöst zu verfolgen. Ich konnte den Reaktionsverlauf durch Verwendung von 8-NBD-cAMP anhand der Fluoreszenzänderung beobachten.

Wie genau läuft nun ein solches Experiment ab? Um die „*off*-Rate“ von 8-NBD-cAMP zu bestimmen, habe ich Konkurrenzexperimente durchgeführt: Zunächst wurde das CNBD-Protein mit 8-NBD-cAMP gemischt und dann unterschiedlich lange gewartet, bevor der Protein-8-NBD-cAMP-Komplex mit einem sehr

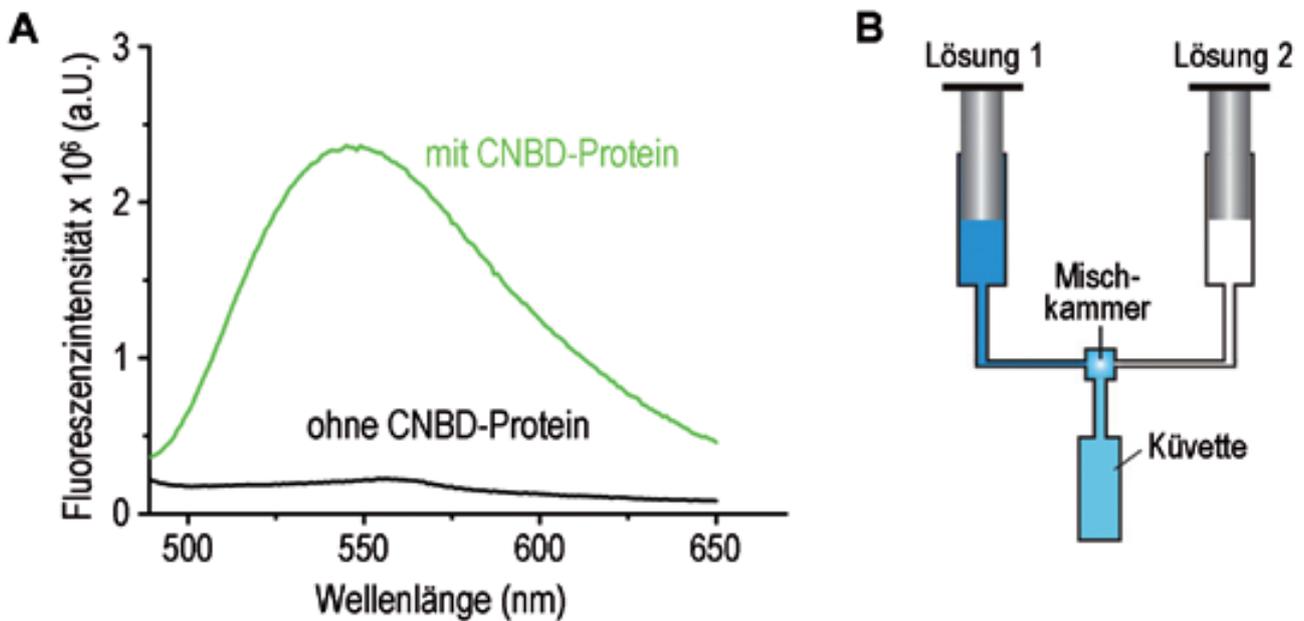


Abbildung 2: Werkzeuge für die Bestimmung der „offRate“. **A.** Fluoreszenzemissionsspektrum von 8-NBD-cAMP ohne und mit CNBD-Protein. In Anwesenheit des CNBD-Proteins steigt die Fluoreszenz deutlich an. **B.** Aufbau der „Stopped Flow“-Apparatur. Zwei Lösungen können in der Mischkammer sehr schnell gemischt werden und innerhalb von nur 325 μ s von der Mischkammer in die Küvette befördert werden.

großen Überschuss cAMP gemischt wurde. Wenn der cAMP-Überschuss groß ist, hat das 8-NBD-cAMP – wenn es erst einmal vom Protein abdissoziiert ist – keine Chance, wieder an das Protein zu binden. Es wird gegen cAMP ausgetauscht. Da nun das fluoreszierende 8-NBD-cAMP nicht mehr gebunden vorliegt, beobachtet man geringere Fluoreszenzwerte. Die Versuche haben gezeigt, dass es mitunter sehr lange dauert, bis das 8-NBD-cAMP vollständig gegen cAMP ausgetauscht worden ist (Abbildung 3): Es dauerte mehr als 400 Sekunden, bis das 8-NBD-cAMP vollständig von cAMP verdrängt war. Zum Vergleich: Bei der isolierten CNBD eines verwandten Kanals aus dem Bakterium *Mesorhizobium loti* ist der Reaktionsverlauf nach 40 Sekunden vollständig abgeschlossen [4]. Zusätzlich zeigen die Messungen, dass der Zeitverlauf der Fluoreszenzänderungen biphasisch ist: Die Reaktion wird durch eine schnelle

kinetische Komponente zu Beginn der Reaktion – in Abbildung 3 nur noch als dünner Strich erkennbar – und eine langsame kinetische Komponente am Ende der Reaktion beschrieben. Vermutlich repräsentieren die beiden Komponenten zwei unterschiedliche oligomere Zustände. Wie lange halten die beiden verschiedenen Zustände das 8-NBD-cAMP fest? Diese Frage lässt sich durch die Analyse der Zeitkonstanten beantworten. Die Zeitkonstante gibt die mittlere Zeit an, in der ein 8-NBD-cAMP Molekül vom CNBD-Protein abdissoziiert. Die Auswertung der Daten hat für die schnelle Komponente eine Zeitkonstante von 0,47 s ergeben und für die langsame Komponente eine Zeitkonstante von 83 s. Bei der schnellen Komponente bleibt also das 8-NBD-cAMP Molekül 0,47 s gebunden, während es bei der langsamen Komponente sogar 83 s am Protein verweilt.

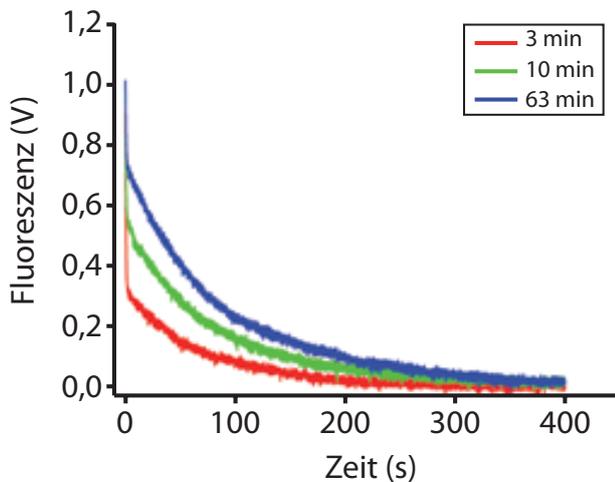


Abbildung 3: Konkurrenzexperiment mit dem CNBD-Protein. Das CNBD-Protein wurde unterschiedlich lange mit 8-NBD-cAMP vorinkubiert und anschließend mit einem Überschuss cAMP gemischt. Der Zeitverlauf der Fluoreszenzänderung wurde aufgezeichnet.

Es stellte sich die Frage, welche zwei unterschiedlichen oligomeren Zustände beobachtet werden. Welcher oligomere Zustand hält das 8-NBD-cAMP so viel länger fest? Diese Frage habe ich mit Hilfe einer anderen Methode beantwortet, der sogenannten Größenausschlusschromatographie. Mit dieser Methode können Proteine anhand ihrer Größe aufgetrennt werden. Kleine und große Proteine durchwandern die Chromatographiesäule unterschiedlich schnell. Die Säule besteht – vereinfacht ausgedrückt – aus kleinen, porösen Kügelchen. Kleinere Proteine können durch diese Poren in die Kügelchen einwandern, während größere Proteine ausgeschlossen werden. Folglich legen größere Proteine auf ihrem Weg durch die Säule eine kürzere Strecke zurück als kleinere Proteine und eluieren zuerst von der Säule. Die Elution der verschiedenen Proteine kann durch Messung der Absorption verfolgt und in einem Chromatogramm aufgezeichnet werden. Kalibriert man die Säule vorher mit Proteinen bekannter Größe, so kann man das Elutionsvolumen eines jeden Proteins einer

Molekülmasse zuordnen.

Für meinen Versuch habe ich das CNBD-Protein eine Stunde mit 8-NBD-cAMP inkubiert und den Protein-Ligand-Komplex anschließend auf die Chromatographiesäule aufgetragen. Das Chromatogramm (Abbildung 4) zeigt drei Peaks. Ich konnte jedoch zeigen, dass das CNBD-Protein nur in den ersten beiden Peaks vorkommt. Der erste Peak entspricht dem Tetramer und der zweite Peak dem Monomer. Aber an welchem Zustand bleibt das 8-NBD-cAMP länger gebunden? Auch hier habe ich eine Art Konkurrenzexperiment durchgeführt: Der Laufpuffer enthielt cAMP, das mit 8-NBD-cAMP um das CNBD-Protein konkurriert. Verfolgt man nun die Elution des 8-NBD-cAMP, so stellt man fest, dass der 8-NBD-cAMP-Peak und der Tetramer-Peak übereinstimmen. Das heißt, das Tetramer – aber nicht das Monomer – eluiert gemeinsam mit dem 8-NBD-cAMP. Was können wir aus dieser Beobachtung schließen? Zu Beginn des Versuchs war der einzige Ligand, der zur Verfügung stand, das 8-NBD-cAMP. Folglich war auch das CNBD-Protein vollständig mit diesem Liganden besetzt. Während der Größenausschlusschromatographie stand jedoch auch das cAMP aus dem Laufpuffer als Ligand zur Verfügung, d.h. das 8-NBD-cAMP konnte gegen cAMP ausgetauscht werden. Tatsächlich geschieht dieser Austausch im Monomer, während im Tetramer das 8-NBD-cAMP gebunden bleibt. Dies bedeutet: 8-NBD-cAMP bleibt viel länger am Tetramer als am Monomer gebunden!

Damit lassen sich auch die beiden Zeitkonstanten, die ich mit Hilfe der „Stopped Flow“-Technik bestimmt habe, den verschiedenen oligomeren Zuständen zuordnen: Die Zeitkonstante von 0,47 s entspricht dem Monomer und die Zeitkonstante von 83 s dem Tetramer. Die Oligomerisierung beeinflusst also

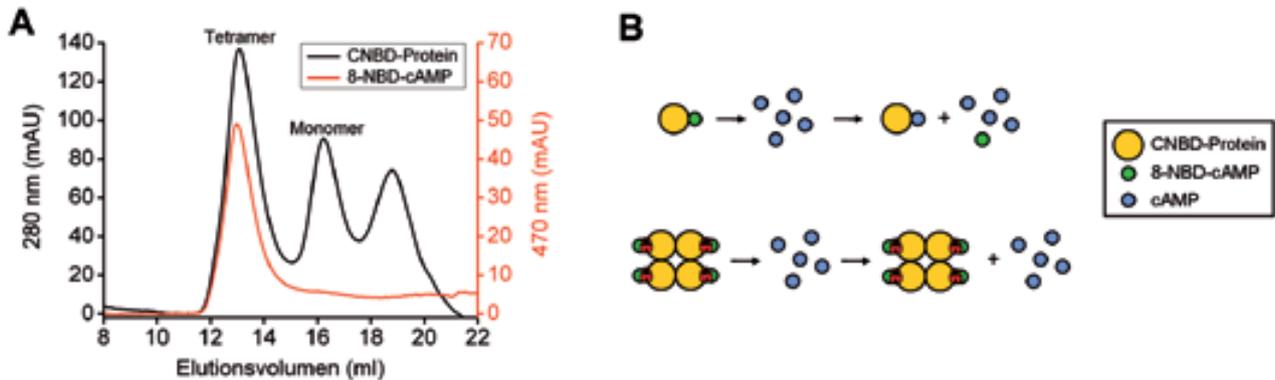


Abbildung 4: Größenausschlusschromatographie des CNBD-Proteins. A. Die schwarze Linie repräsentiert die Elution der Proteine, die rote Linie die Elution von 8-NBD-cAMP. Nur das Tetramer eluiert zusammen mit 8-NBD-cAMP. B. Im Monomer wird das 8-NBD-cAMP gegen cAMP aus dem Laufpuffer ausgetauscht. Im Tetramer bleibt das 8-NBD-cAMP gebunden.

dramatisch die Lebensdauer des cAMP-CNBD-Komplexes! 8-NBD-cAMP bleibt über 100x länger am Tetramer gebunden als am Monomer.

Wie gut gibt dieses Modell des isolierten CNBD-Proteins die Eigenschaften des vollständigen HCN2-Kanals wieder? Hierzu machten Kusch und Kollegen eine spannende Entdeckung: Im ganzen HCN2-Kanal werden zwei der insgesamt vier gebundenen cAMP-Moleküle so fest gebunden, dass sie über einen langen Zeitraum nicht wieder von der CNBD abdissoziieren. Infolgedessen bleiben die Kanäle ungewöhnlich lange aktiviert [5]. Für die physiologische Funktion der HCN-Kanäle könnte dies bedeuten, dass eine kurzzeitige Erhöhung der cAMP-Konzentration zu einem lang anhaltenden physiologischen Effekt durch die HCN-Kanäle führen kann. Wird im Herzen beispielsweise durch Stress die cAMP-Konzentration nur kurz erhöht, so sind die HCN-Kanäle vermutlich auch noch aktiv, wenn das cAMP schon längst wieder abgebaut ist.

Referenzen

- [1] Kaupp, U.B. and Seifert, R. (2001) "Molecular diversity of pacemaker ion channels" *Annu. Rev. Physiol.* 63, 235-257
- [2] Zagotta, W.N., Olivier, N.B., Black, K.D., Young, E.C., Olson, R., and Gouaux, E. (2003) "Structural basis for modulation and agonist specificity of HCN pacemaker channels" *Nature* 425, 200-205
- [3] Cukkemane, A., Gruter, B., Novak, K., Gensch, T., Bonigk, W., Gerharz, T., Kaupp, U.B., and Seifert, R. (2007) "Subunits act independently in a cyclic nucleotide-activated K⁺ channel" *EMBO Rep.* 8, 749-755
- [4] Peuker, S. (2011) „Untersuchungen zur Dynamik einer Bindestelle für zyklische Nukleotide“, Dissertation: Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität zu Köln
- [5] Kusch *et al.*; unpubliziert



Friederike Winkhaus hat Biologie an der Universität zu Köln studiert. Für ihre Arbeit zur quantitativen Bestimmung der Ligandenbindung von HCN2-Schrittmacherkanälen bei Herrn Prof. Dr. Kaupp am For-

schungszentrum Jülich erhielt sie im Mai 2007 ihr Diplom. Dieses Projekt war Ausgangspunkt für ihre Doktorarbeit – zunächst am Forschungszentrum Jülich und später im Forschungszentrum caesar. Im November 2010 hat sie ihren Dokortitel erhalten. Seit Dezember 2010 ist sie als wissenschaftliche Mitarbeiterin im Forschungszentrum caesar tätig. Während ihrer Promotion war sie Mitglied der „International Helmholtz Research School of Biophysics and Soft Matter (IHRS BioSoft)“.

Publikationen 2010

Bulic, B., Pickhardt, M., Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. (2010) „Tau protein and tau aggregation inhibitors“ *Neuropharmacology* 59, 276-289

Cheyne, M., Pokrant, S., Irsen, S., and Krüger, P. (2010) „New fine structures resolved at the ELNES Ti-L_{2,3} edge spectra of anatase and rutile: comparison between experiment and calculation“ *Ultramicroscopy* 110, 1046-1053

Degistirci, O., Gräbels, F., Irsen, S., Schmid, K.W., and Thie, M. (2010) „Using human neural crest-derived progenitor cells to investigate osteogenesis: An in vitro study“ *Matrix Biol.* 29, 219-227

Elgeti, J., Kaupp, U.B., and Gompper, G. (2010) „Hydrodynamics of sperm cells near surfaces“ *Biophys. J.* 99, 1018-1026

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

Georgiev, P., Okkenhaug, H., Drews, A., Wright, D., Lambert, S., Flick, M., Carta, V., Martel, C., Oberwinkler, J., and Raghu, P. (2010) „TRPM channels mediate zinc homeostasis and cellular growth during *Drosophila* larval development“ *Cell Metab.* 12, 386-397

Hamann, S., Gruner, M.E., Irsen, S., Buschbeck, J., Bechtold, C., Kock, I., Mayr, S.G., Savan, A., Thienhaus, S., Quandt, E., Fähler, S., Entel, P., and Ludwig, A. (2010) „The ferromagnetic shape memory system Fe-Pd-Cu“ *Acta Materialia* 58, 5949-5961

Harzheim, D., Talasila, A., Movassagh, M., Foo, R.S., Figg, N., Bootman, M.D., and Roderick, H.L. (2010) „Elevated InsP₃R expression underlies enhanced calcium fluxes and spontaneous extra-systolic calcium release events in hypertrophic cardiac myocytes“ *Channels (Austin)* 4, 67-71

Kaupp, U.B. (2010) „Olfactory signalling in vertebrates and insects: differences and commonalities“ *Nature Rev. Neurosci.* 11, 188-200

Richter, L., Munter, L.M., Ness, J., Hildebrand, P.W., Dasari, M., Unterreitmeier, S., Bulic, B., Beyermann, M., Gust, R., Reif, B., Weggen, S., Langosch, D., and Multhaup, G. (2010) „Amyloid beta 42 peptide (Aβ₄₂)-lowering compounds directly bind to Aβ and interfere with amyloid precursor protein (APP) transmembrane dimerization“ *PNAS* 107, 14597-14602

Schünke, S., Lecher, J., Stoldt, M., Kaupp, U.B., and Willbold, D. (2010) „Resonance assignments of the nucleotide-free wildtype MloK1 cyclic nucleotide-binding domain“ *Biomol. NMR assign.* 4, 147-150

Smyrniak, I., Mair, W., Harzheim, D., Walker, S.A., Roderick, H.L., and Bootman, M.D. (2010) „Comparison of the T-tubule system in adult rat ventricular and atrial myocytes, and its role in excitation-contraction coupling and inotropic stimulation“ *Cell Calcium* 47, 210-223

Sturm, D., Heilmaier, M., Saage, H., Aguilar, J., Schmitz, G.J., Drevermann, A., Palm, M., Stein, F., Engberding, N., Kelm, K., and Irsen, S. (2010) „Creep strength of a binary Al₆₂Ti₃₈ alloy“ *Int. J. Mater. Res.* 101, 676-679

Wiedemann, U., Karapetyan, K., Dan, C., Pritzkau, D., Alt, W., Irsen, S., and Meschede, D. (2010) „Measurement of submicrometre diameters of tapered optical fibres using harmonic generation“ *Opt. Express* 18, 7693-7704

Personal

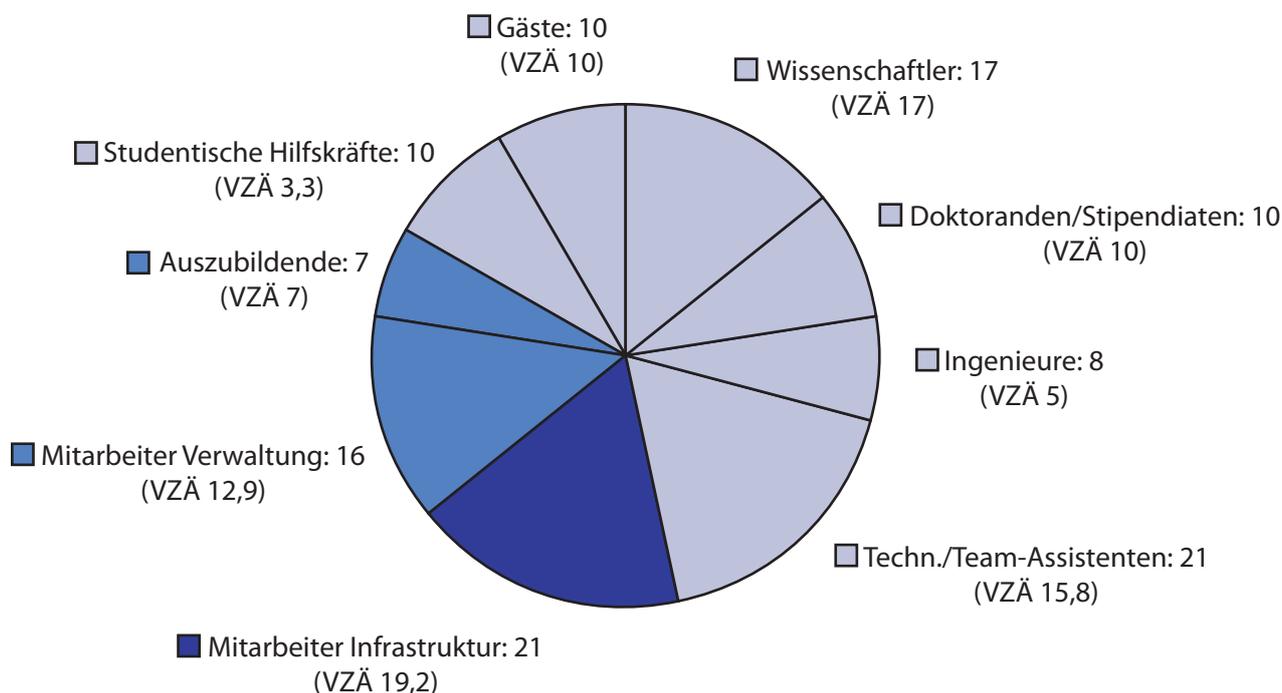
Personalstruktur

Bei der Stiftung caesar waren zum 01.01.2011 insgesamt 120 Personen beschäftigt. 110 Personen davon waren caesar-MitarbeiterInnen (Vollzeit-Äquivalent 93); 10 weitere waren als Gastwissenschaftler tätig. Somit wurden im Rahmen des wissenschaftlichen Aufbaus im vergangenen Jahr 15 neue Stellen eingerichtet. 76 MitarbeiterInnen arbeiteten im wissenschaftlichen Bereich. Die Verteilung der MitarbeiterInnen auf die einzelnen Funktionsbereiche ergibt sich aus der untenstehenden Graphik. In der nachfolgenden Auswertung sind die Gastwissenschaftler (10) nicht

berücksichtigt.

Die Zahl der MitarbeiterInnen mit befristeten und unbefristeten Verträgen ist ausgewogen. 51,8% der MitarbeiterInnen sind unbefristet beschäftigt, überwiegend im Infrastruktur- und im Verwaltungsbereich. Die 48,2% befristeten Verträge verteilen sich hauptsächlich auf die wissenschaftlichen Arbeitsbereiche.

caesar ist ein „junges“ Forschungsinstitut mit einem Altersdurchschnitt von 35 Jahren. Daher und aus Gründen der Personalbindung und -akquirierung hat



Mitarbeiteranzahl und -verteilung am 1.1.2011

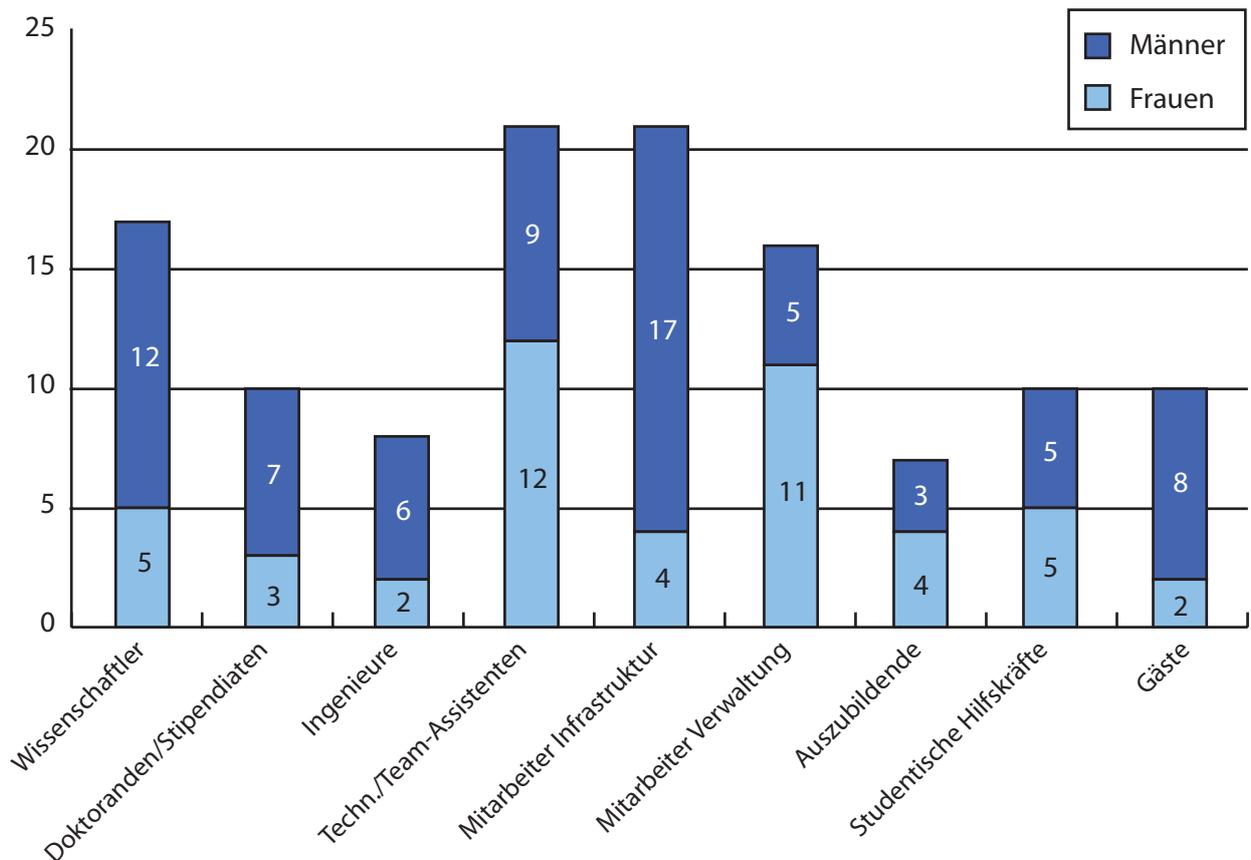
caesar ein Konzept entwickelt, das die Vereinbarkeit von Beruf und Familie erleichtern soll.

Im Rahmen der Zertifizierung durch die Hertie-Stiftung konnten wir einige Projekte, wie z.B. die Gründung einer Kita oder die Einrichtung eines Eltern/Kind-Offices, umsetzen und auf den Weg bringen. Am 19. Mai 2011 wurde caesar das Zertifikat der Hertie-Stiftung „berufundfamilie“ verliehen.

caesar verfügt über einen hohen Frauenanteil von 42%. Im wissenschaftlichen Bereich ist geplant,

diesen Anteil noch weiter zu steigern. Die Aufteilung von weiblichen und männlichen Mitarbeitern, orientiert an den einzelnen Funktionsbereichen, ist in der untenstehenden Graphik dargestellt.

Verstärkt wurden auch im vergangenen Jahr die Bemühungen um die Nachwuchsförderung. So stellen Studenten, Auszubildende und Doktoranden gemeinsam 29,7% der Beschäftigten. Als neuen Lehrberuf hat caesar in 2010 die Ausbildung zum „Elektroniker für Gebäude- und Infrastruktursysteme“ aufgenommen.



Finanzen

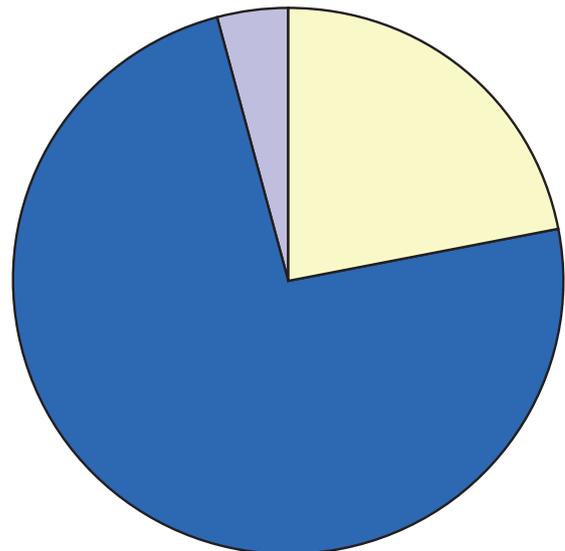
Grundstock der Stiftung caesar

caesar wurde als gemeinnützige Stiftung des privaten Rechts von der Bundesrepublik Deutschland und dem Land Nordrhein-Westfalen, im Rahmen des Bonn-Berlin-Ausgleiches, gegründet.

Das Stiftungsvermögen beträgt 383,4 Mio. € plus 6,6 Mio. €. Grundstückswert, den caesar von der Stadt Bonn erhalten hat.

286,3 Mio. € des Stiftungskapitals wurden langfristig am Kapitalmarkt angelegt, die Erträge finanzieren unter anderem die Forschung an caesar.

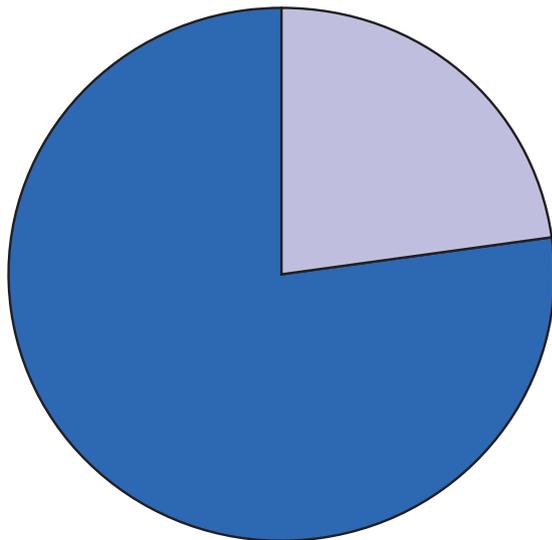
Vermögen



- Sachanlagen
- Finanzanlagen
- Sonstige

Sachanlagen	88.474.284 €
Finanzanlagen	295.349.227 €
Sonstige	18.001.425 €
Bilanzsumme	401.824.936 €

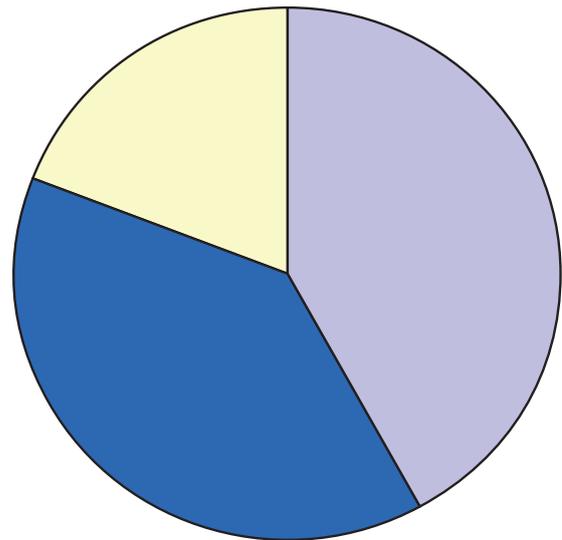
Erträge



- Erträge aus Umsatzerlösen und Förderprojekten
- Erträge aus Wertpapieren und Zinsen

Erträge aus Umsatzerlösen und Förderprojekten	3.253.211 €
Erträge aus Wertpapieren und Zinsen	10.844.427 €
Erträge insgesamt	14.097.638 €

Aufwendungen



- Personalaufwand
- Sachaufwand
- Abschreibungen

Personalaufwand	4.985.298 €
Sachaufwand	4.677.161 €
Abschreibungen	2.296.429 €
Aufwendungen insgesamt	11.958.888 €

Jahresbilanz 2010

Bilanzabschluss zum 31. Dezember 2010 (Angaben in €)

Aktiva	31.12.2010	31.12.2009
A. Anlagevermögen		
I. Immaterielle Vermögensgegenstände	91.616	76.055
II. Sachanlagen		
Grundstücke & Bauten *)	71.963.012	71.541.448
Andere Anlagen	13.602.539	14.752.286
Geleistete Anzahlungen & Anlagen im Bau	2.908.733	73.363
Summe aus II.	88.474.284	86.367.097
III. Finanzanlagen		
Beteiligungen	150.000	220.942
Wertpapiere des Anlagevermögens zur Anlage des Stiftungsvermögen	292.148.269	287.698.307
Wertpapiere des Anlagevermögens zur Gebäudewiederbeschaffung	3.050.958	2.278.707
Summe aus III.	295.349.227	290.197.956
Summe für A.	383.915.127	376.641.108
B. Umlaufvermögen		
I. Vorräte	259.887	259.729
II. Forderungen und sonstige Vermögensgegenstände		
Forderungen aus Lieferungen und Leistungen	104.862	184.225
Forderungen gegen Unternehmen, mit denen ein Beteiligungsverhältnis besteht	0	658.819
Sonstige Vermögensgegenstände	1.906.369	1.048.263
Summe aus II.	2.011.231	1.891.307
III. Wertpapiere	3.469.000	11.055.442
IV. Kassenbestand, Bundesbankguthaben, Guthaben bei Kreditinstituten und Schecks	11.941.102	7.179.812
Summe für B.	17.681.220	20.386.290
C. Rechnungsabgrenzungsposten	228.589	212.063
Gesamtes Vermögen	401.824.936	397.239.434

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

Passiva	31.12.2010	31.12.2009
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	3.805.847	2.772.186
Instandhaltungsrücklage	2.443.789	0
III. Ergebnis		
Jahresüberschuss/- Fehlbetrag	0	-105.088
Summe für A.	397.683.554	394.101.016
B. Sonderposten aus Investitionszuschüssen	2.817.780	0
C. Rückstellungen		
Instandhaltungsrücklage *)	0	1.943.800
Sonstige Rückstellungen	198.474	154.594
Summe für C.	198.474	2.098.394
D. Verbindlichkeiten		
Verbindlichkeiten aus Lieferungen und Leistungen	882.194	598.438
Sonstige Verbindlichkeiten	228.685	395.187
Summe für D.	1.110.879	993.625
E. Rechnungsabgrenzungsposten	14.249	46.399
Gesamtes Vermögen	401.824.936	397.239.434

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



Organe der Stiftung

Stiftungsrat

Zum 31.12.2010 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

MinDir'in Bärbel Brumme-Bothe

Leiterin der Abteilung 6 im Bundesministerium für Bildung und Forschung

Helmut Dockter

Staatssekretär im Ministerium für Innovation, Wissenschaft, Forschung und Technologie des Landes NRW

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

Tankred Schipanski
Mitglied des Deutschen Bundestages

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

Karl Schultheis
Mitglied des Landtages NRW

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

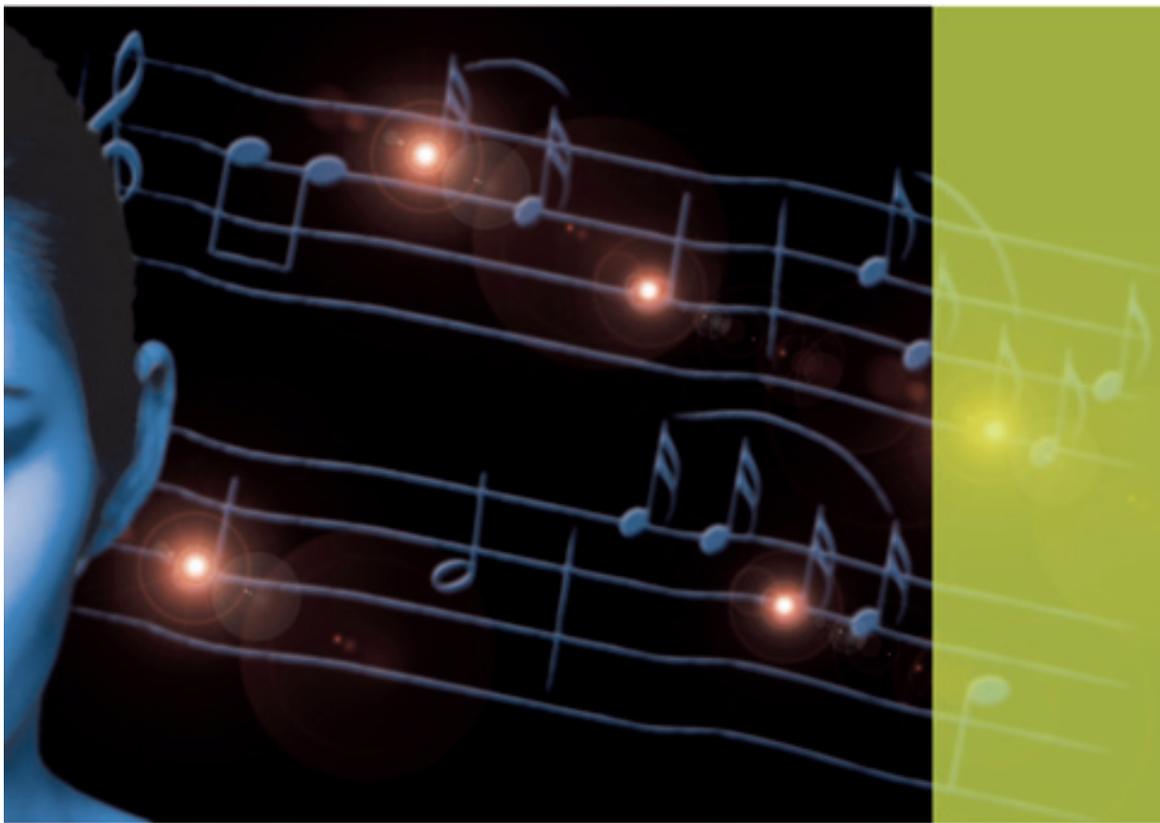
Prof. Dr. Martin Stratmann
Max-Planck-Institut für Eisenforschung GmbH

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

Vorstand

Zum 31.12.2010 war der Vorstand wie folgt zusammengesetzt:

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



caesarium

Vortragsreihe „Die fünf Symphonien der Sinne“

Forschungszentrum caesar, Hörsaal
Donnerstag, 29.04.2009, 19 h

„Wie kommt der Klang in den Kopf? -
Hören und Schwerhörigkeit“

Prof. Dr. Tobias Moser
Abteilung für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde
Universität Göttingen

caesar

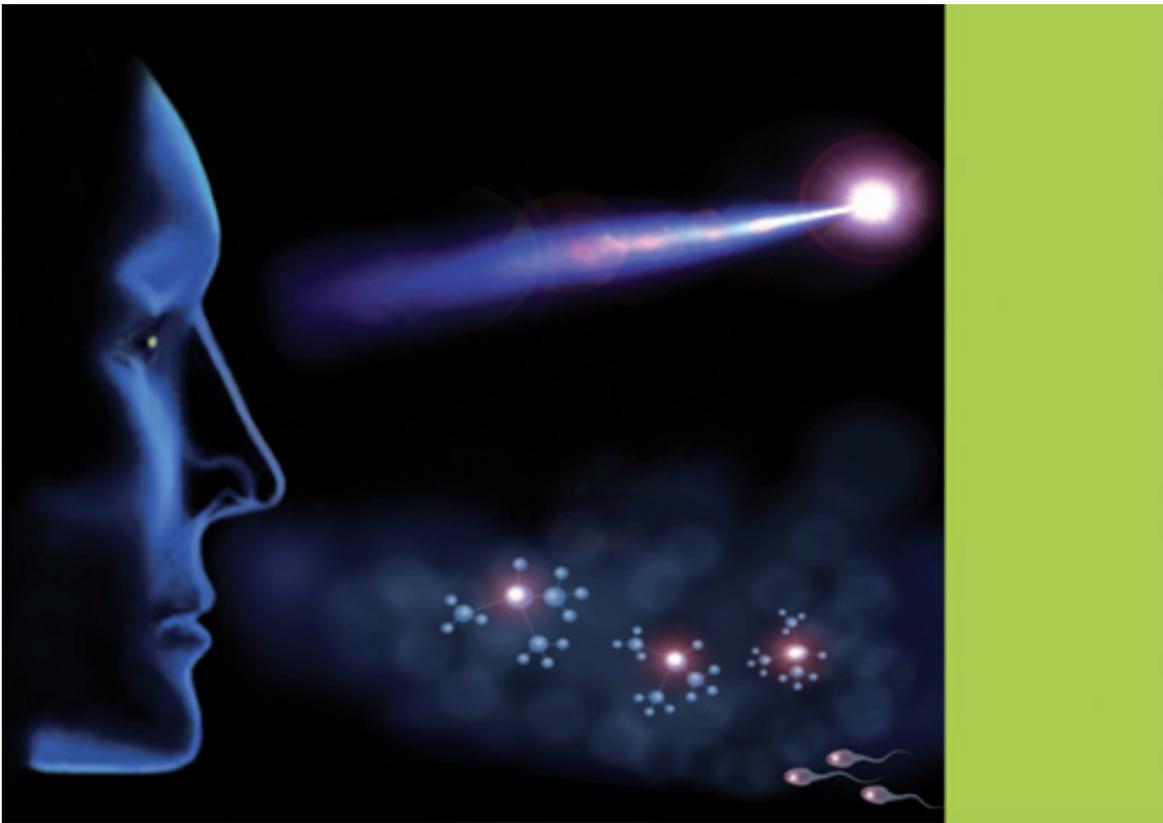
center of advanced
european studies
and research

www.caesar.de

Forschungszentrum caesar
Ludwig-Erhard-Allee 2
53175 Bonn



Stiftung caesar -
assoziiert mit der
Max-Planck-Gesellschaft



caesarium

Vortragsreihe „Die fünf Symphonien der Sinne“

Forschungszentrum caesar, Hörsaal
Donnerstag, 10.06.2010, 19 h

**„Extreme Sinnesleistungen -
Über das Sehen und Riechen“**

Prof. Dr. U. Benjamin Kaupp
Abteilung Molekulare Neurosensorik
Forschungszentrum caesar

caesar

center of advanced
european studies
and research

www.caesar.de

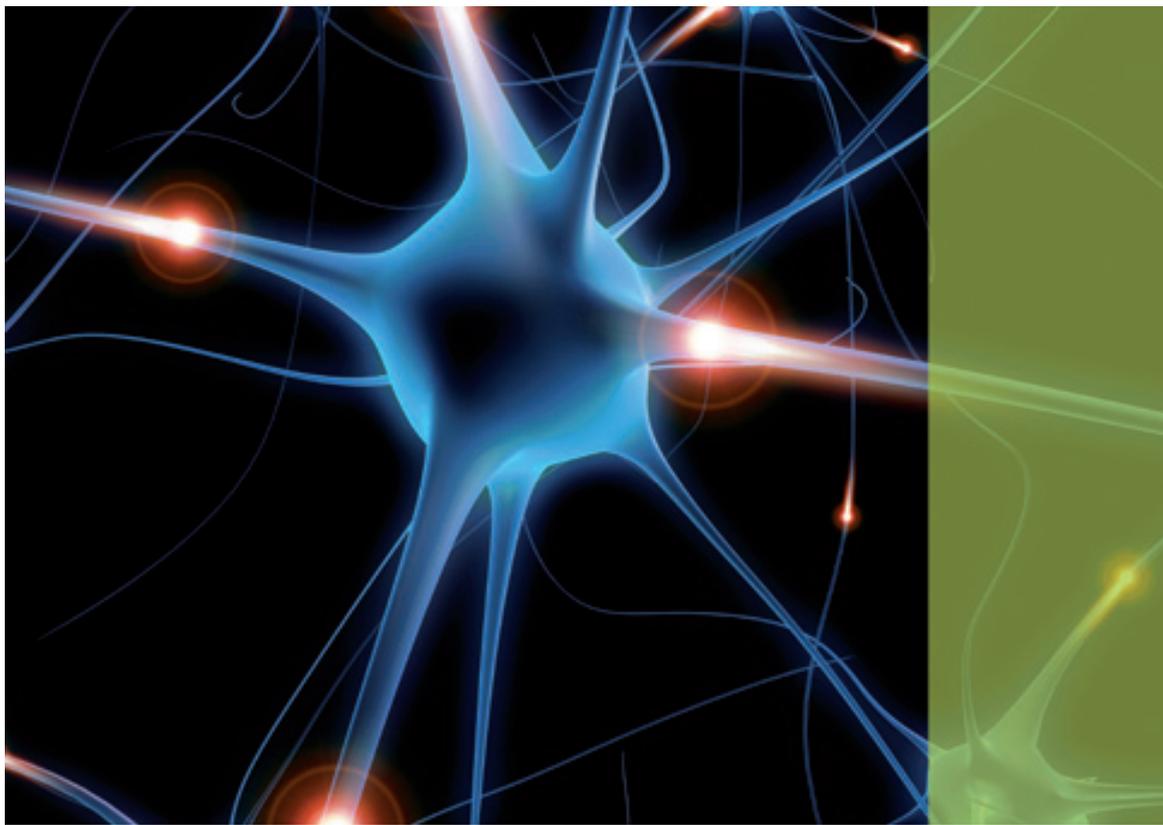
Forschungszentrum caesar
Ludwig-Erhard-Allee 2
53175 Bonn



Stiftung caesar -
assoziiert mit der
Max-Planck-Gesellschaft

caesar

center of advanced
european studies
and research



caesarium

Forschungszentrum caesar, Hörsaal

Donnerstag, 04.11.2010, 19 h

„Alzheimer - eine heimtückische Krankheit wird entschlüsselt“

Prof. Dr. Christian Haass

Deutsches Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen (DZNE)

und Adolf-Butenandt-Institut

Ludwig-Maximilians-Universität

München

caesar

center of advanced
european studies
and research

www.caesar.de

Forschungszentrum caesar
Ludwig-Erhard-Allee 2
53175 Bonn



Stiftung caesar -
assoziiert mit der
Max-Planck-Gesellschaft

caesar



center of advanced
european studies
and research

Impressum

Herausgeber	Stiftung caesar Ludwig-Erhard-Allee 2 D-53175 Bonn
Redaktion und Konzept	Prof. Dr. U. Benjamin Kaupp Gertrud Bilski Dr. Jürgen Reifarth Stefan Hartmann
Textlayout	Diana Sigl Stefan Hartmann
Graphikbearbeitung	Dr. Corinna Bernsdorff
Cover	Dr. René Pascal
Druck	SP Medienservice Friesdorfer Str. 122 53173 Bonn - Bad Godesberg
© 2011	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

caesar



center of advanced
european studies
and research
