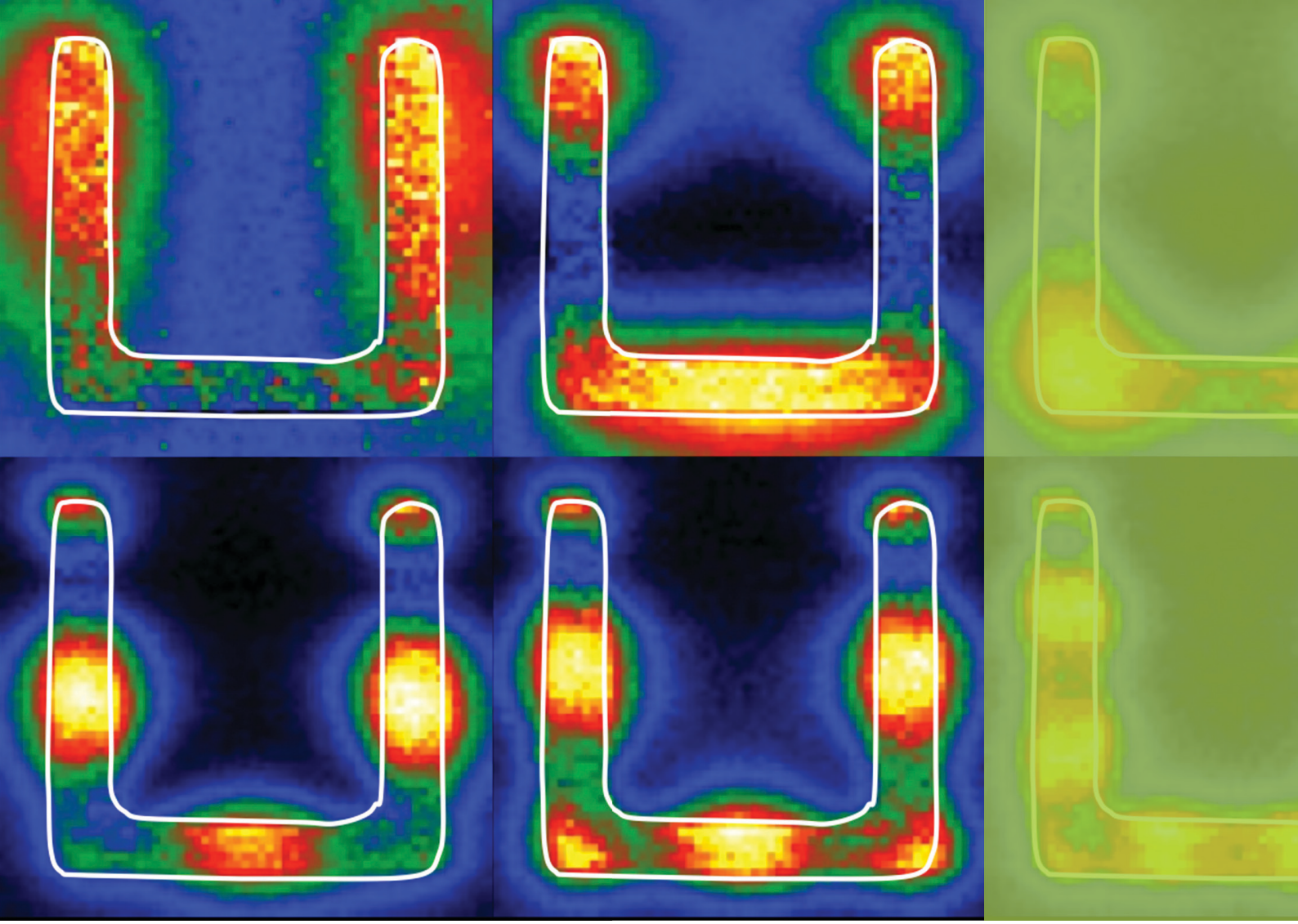


Jahresbericht 2012

caesar

center of advanced
european studies
and research

Stiftung caesar -
assoziiert mit der
Max-Planck-Gesellschaft

Stiftung caesar -
assoziiert mit der
Max-Planck-Gesellschaft

caesar

center of advanced
european studies
and research

Jahresbericht 2012

Inhaltsverzeichnis

Vorwort 7

Forschungsberichte
Die supramolekulare Struktur von Rhodopsin in Sehstäbchen
Monika Gunkel 11

Basic principles for gradient sensing
Luis Alvarez 19

GBA2 – Ein neuer Ansatzpunkt zur Therapie von *Morbus Gaucher* – einer Fettstoffwechselkrankheit
Heinz G. Körschen und Dagmar Wachten 25

Wie man Flüssigkeiten mischt – oder auch nicht
Siegfried Steltenkamp und Manfred Lacher 31

Nanophotonik
Stephan Irsen, Felix von Cube und Stefan Linden 39

Berichte über abgeschlossene Doktorarbeiten
CNGK: Ein außergewöhnlicher Ionenkanal für externe Befruchtung?
Sylvia Fechner 47

Die zwei Gesichter des Lockstoffrezeptors in Seeigelspermien
Magdalena Pichlo *55*

Publikationen 60

Zahlen und Fakten
Personal 67
Finanzen 69
Organe der Stiftung 72
caesarium 74

Vorwort

Seit fünf Jahren ist Professor U. Benjamin Kaupp inzwischen wissenschaftlicher Direktor bei caesar. Seitdem ist das Forschungszentrum zunehmend in die Max-Planck-Gesellschaft hineingewachsen. Die Minerva wurde ins Logo aufgenommen, und die Stiftung caesar trägt den Zusatz „assoziiert mit der Max-Planck-Gesellschaft". Caesar hat sich intern gewissermaßen zu einem Max-Planck-Institut entwickelt und ist selbstverständlich in die wissenschaftliche Kooperation und Diskussion der Gesellschaft integriert.

Im Jahr 2012 wurde das Forschungszentrum bereits zum zweiten Mal vom Fachbeirat nach den Kriterien der Max-Planck-Gesellschaft begutachtet. Auch wenn eine solche Evaluation nie Routine wird, gehört sie nun für alle Beteiligten genauso zum Rhythmus des Institutslebens wie regelmäßige Doktorandenseminare oder Kolloquien mit externen Wissenschaftlern. Die Ergebnisse der Begutachtung sind wiederum überaus erfreulich. Die Mitglieder des Beirats – international anerkannte Experten aus den Bereichen Neurobiologie, Biochemie, Pharmakologie, Entwicklungsneurobiologie und Molekulare Medizin – haben das Institut hervorragend bewertet und caesar in seiner grundsätzlichen Ausrichtung bekräftigt. Der wissenschaftliche Anspruch, die organisatorische Anbindung an die Max-Planck-Gesellschaft und die personelle Weiterentwicklung nach den Max-Planck-Kriterien wird von allen Seiten anerkannt.

Bereits im Jahr 2011 wurde die erste Max-Planck-Forschungsgruppe bei caesar eingerichtet. Das Berufungsverfahren erfolgte nach den strengen Regeln der Max-Planck-Gesellschaft; finanziert wird die Gruppe durch die Boehringer Ingelheim GmbH. Im Laufe des Jahres 2012 hat Dr. Annett Halle ihre Gruppe „Neuroimmunologie" vollständig aufgebaut und eng mit der Forschung in der Region vernetzt. Unter anderem ist sie Teil des Exzellenz-Clusters „Neurosensation" der Universität Bonn.

Darüber hinaus beteiligt sich caesar erstmals an einer International Max Planck Research School (IMPRS). Die Partner in der IMPRS for Biology of Ageing sind die Max-Planck-Institute für Biologie des Alterns und für neurologische Forschung sowie der Exzellenzcluster „Cellular Stress Responses in Aging-Associated Diseases" der Universität zu Köln. Die School ist genehmigt und soll 2013 aufgebaut werden.

Ein weiterer Meilenstein für die Einbindung des Instituts in die regionale Forschungslandschaft war die Ernennung von Professor Michael Famulok zum ersten Max-Planck-Fellow am Forschungszentrum caesar. Durch diese Berufung wurde zum einen ein zentrales Kooperationsinstrument der Max-Planck-Gesellschaft bei caesar eingeführt. Zum anderen wird die enge Zusammenarbeit zwischen caesar und der Universität Bonn weiter gestärkt. Professor Famulok leitet seit 1. Januar 2013 eine Arbeitsgruppe bei caesar, die sich mit der Strukturaufklärung von Biomolekülen und der chemischen Biologie von photoaktivierbaren Substanzen beschäftigt. Die Arbeitsgruppe ist zunächst auf fünf Jahre befristet; das Budget wird je zur Hälfte von caesar und der Universität Bonn finanziert.

Bereits am 1. September 2012 ist eine Forschungsgruppe zur physikalischen Biochemie bei caesar gestartet; die Leitung hat Dr. Matthias Geyer. Er setzt bei caesar seine Arbeiten aus dem Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund, fort. Die Gruppe bearbeitet zwei Themen: die Regulation der Transkription und den Umbau des Zytoskelettes an der Zellmembran.

Caesar ist mittlerweile also nachhaltig etabliert: in der neurowissenschaftlichen und zellbiologischen Community, in der Max-Planck-Gesellschaft und in der Forschungslandschaft Nordrhein-Westfalens.

Bonn, im März 2013

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

Prof. Dr. U. Benjamin Kaupp
Wissenschaftlicher Direktor

Gertrud Bilski
Kaufmännische Geschäftsführerin

Forschungsberichte

Die supramolekulare Struktur von Rhodopsin in Sehstäbchen

Monika Gunkel

Kontakt
Monika Gunkel
Forschungszentrum caesar
Abteilung Molekulare Neurosensorik
Telefon: (0228) 9656-342
monika.gunkel@caesar.de

Der Sehsinn ist für viele Tiere und für uns Menschen der wichtigste Sinn. Über die Augen nehmen wir Farben, Formen und Bewegungen wahr. Ein Schlüsselprotein ist der Sehfarbstoff Rhodopsin; es absorbiert Licht, das auf die Sehzellen in der Netzhaut fällt. In der Literatur gibt es seit vielen Jahren eine kontroverse Diskussion über die supramolekulare Organisation von Rhodopsin. Diese Kontroverse konnten wir mit Hilfe der Elektronentomografie klären. Viele Krankheiten, die Blindheit verursachen, sind auf Mutationen im Rhodopsin-Gen und daraus resultierender Degeneration der Netzhaut zurückzuführen. Vielleicht können unsere Erkenntnisse zur Aufklärung einiger Ursachen für Blindheit beitragen.

Der Sehprozess beginnt in Sehzellen der Netzhaut unserer Augen. Wir unterscheiden Sehstäbchen, die für das Sehen in der Dämmerung zuständig sind, und Zapfen, mit denen wir bei Tageslicht Farben erkennen können. In unserer Forschung beschäftigen wir uns mit den Sehstäbchen (Abbildung 1 a). Ein Sehstäbchen besteht aus einem Innen- und einem Außensegment. Das Innensegment enthält den Zellkern, Mitochondrien und die Synapse, also die „Schnittstelle" zum Nervensystem. Im Außensegment befinden sich flache, übereinander gestapelte Membranscheibchen, sogenannte *Disks*. Jedes *Disk* besitzt eine Einfaltung (Abbildung 1 a); die Einfaltungen benachbarter *Disks* sind zueinander ausgerichtet, manchmal über hunderte von *Disks*. Rhodopsin ist in der *Disk*-Membran eingelagert.

Was passiert in den Sehstäbchen nach der Absorption eines Photons? Rhodopsin ändert seine Konformation. Dadurch aktiviert Rhodopsin ca. 20 sogenannten *Transducin*-Moleküle, die zur Familie der G-Proteine gehören. Die *Transducin*-Moleküle wiederum aktivieren *Phosphodiesterase*-Moleküle, die ihrerseits tausende von zyklischen Guanosinmonophosphat-Molekülen (cGMP) hydrolysieren, also mit Hilfe von Wasser spalten. Das cGMP-Molekül ist ein zellulärer Botenstoff, der Ionenkanäle öffnet, durch die Na^+-Ionen in die Zelle fließen. Die Kaskade von Reaktionen bewirkt in kürzester Zeit eine enorme Verstärkung des Lichtsignals! Die Folge: Die cGMP-Konzentration nimmt ab (Abbildung 1 b). Ist die cGMP-Konzentration gering, schließen

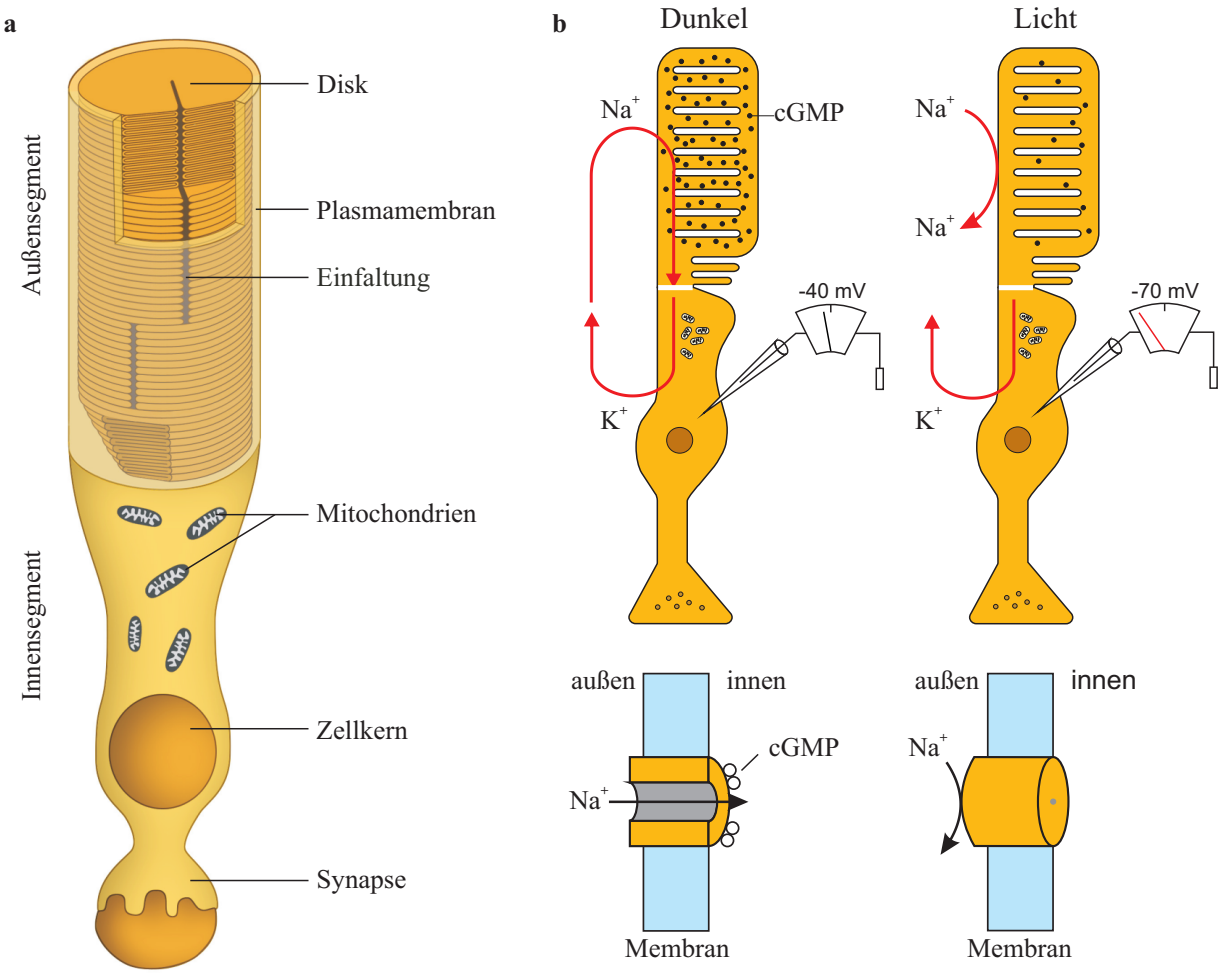


Abbildung 1: Aufbau und Funktion der Sehstäbchen. a. Schematische Darstellung eines Sehstäbchens. Das Sehstäbchen hat ein Außen- und ein Innensegment. Das Innensegment enthält u.a. den Zellkern, Mitochondrien und die Synapse. Das Außensegment besteht aus einem Stapel von flachen Membranscheibchen (*Disks*), die von der Plasmamembran eingeschlossen sind. Jedes *Disk* hat eine Einfaltung. Die Einfaltungen sind über hunderte von *Disks* zueinander ausgerichtet. **b.** Die Reaktion des Sehstäbchens auf den Lichtreiz. Im Dunkeln ist die cGMP-Konzentration im Außensegment hoch, wodurch Ionenkanäle offen gehalten werden. Natrium-Ionen (Na^+) strömen in das Außensegment ein. Im Innensegment gibt es einen Kalium-Ionen-Ausstrom (K^+-Ausstrom). Die Membranspannung wird bei ca. -40 mV gehalten. Bei Belichtung wird cGMP abgebaut und die Kanäle, durch die Na^+ eingeströmt ist, schließen. Der K^+-Ausstrom im Innensegment hält weiter an. Dadurch hyperpolarisiert die Zelle auf ca. -70 mV. Die veränderte Membranspannung ist die Lichtantwort und wird von der Synapse ans Gehirn weitergeleitet.

die Kanäle; der Natriumeinstrom wird unterbrochen. Zusätzlich zum Natriumstrom gibt es auch einen Kaliumkanal, durch den Kalium aus dem Sehstäbchen fließt. Dieser wird durch den Lichtreiz nicht geschlossen. Da positiv geladene Kalium-Ionen aus der Zelle fließen, wird das Membranpotenzial negativer; die Zelle hyperpolarisiert. Dadurch fällt die hemmende Wirkung der Sehstäbchen auf die nachfolgenden Nervenzellen weg. Elektrische Signale werden an das Gehirn weitergeleitet; es kommt zur visuellen Wahrnehmung.

Rhodopsin ist das „Gründungsmitglied" einer großen Familie von Membranrezeptoren, den sogenannten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs). Die Struktur von Rhodopsin und anderen GPCRs wurde mit atomarer Auflösung aufgeklärt und mit dem Nobelpreis für Chemie 2012 an Robert Lefkowitz und Brian Kobilka gewürdigt. Einige Mitglieder der GPCR-Familie können Dimere bilden, also Strukturen, die aus zwei Molekülen bestehen [1]. Für Rhodopsin war bislang unklar, ob es Dimere bildet oder als Monomer vorliegt: Zahlreiche biophysikalische Untersuchungen führten zu widersprüchlichen Ergebnissen. Die hohe Beweglichkeit und Rotation von Rhodopsin in der Membran deuten darauf hin, dass Rhodopsin als Monomer existiert [2]. Andere Experimente hingegen, wie die *Kraftfeld-Mikroskopie,* sprachen für die Dimer-Hypothese [3]. Der springende Punkt ist: In all diesen Studien wurde Rhodopsin in einem nicht natürlichen Zustand untersucht! Es wurden zum Beispiel isolierte Moleküle oder Membranen von aufgebrochenen Zellen verwendet.

Wir haben deshalb Rhodopsin im intakten Netzhautgewebe mit Hilfe der Elektronentomografie „unter die Lupe genommen". Zunächst wurde die intakte Netzhaut von Mäusen aus dem Auge präpariert und durch schockartiges Einfrieren unter hohem Druck konserviert. Diese Methode garantiert, dass die Ultrastruktur der Probe erhalten bleibt. Ein solches Verfahren bezeichnet man als Kryo-Technik (vom altgriechischen κρύος - Frost, Eis, siehe auch caesar-Jahresbericht 2010). Gegenüber herkömmlichen Verfahren hat die Kryo-Technik den Vorteil, dass die biologische Probe weder chemisch fixiert noch angefärbt werden muss, um sie im Elektronenmikroskop sichtbar zu machen. Doch ein anderes Problem könnte uns zu schaffen machen: Es ist wohlbekannt, dass die Bildung von Eiskristallen Gewebe zerstört, also genau das verursacht, was wir vermeiden wollen! Warum kristallisiert Wasser unter unseren Bedingungen nicht? Ganz einfach: Das Wasser kann sich bei der Eisbildung durch den hohen

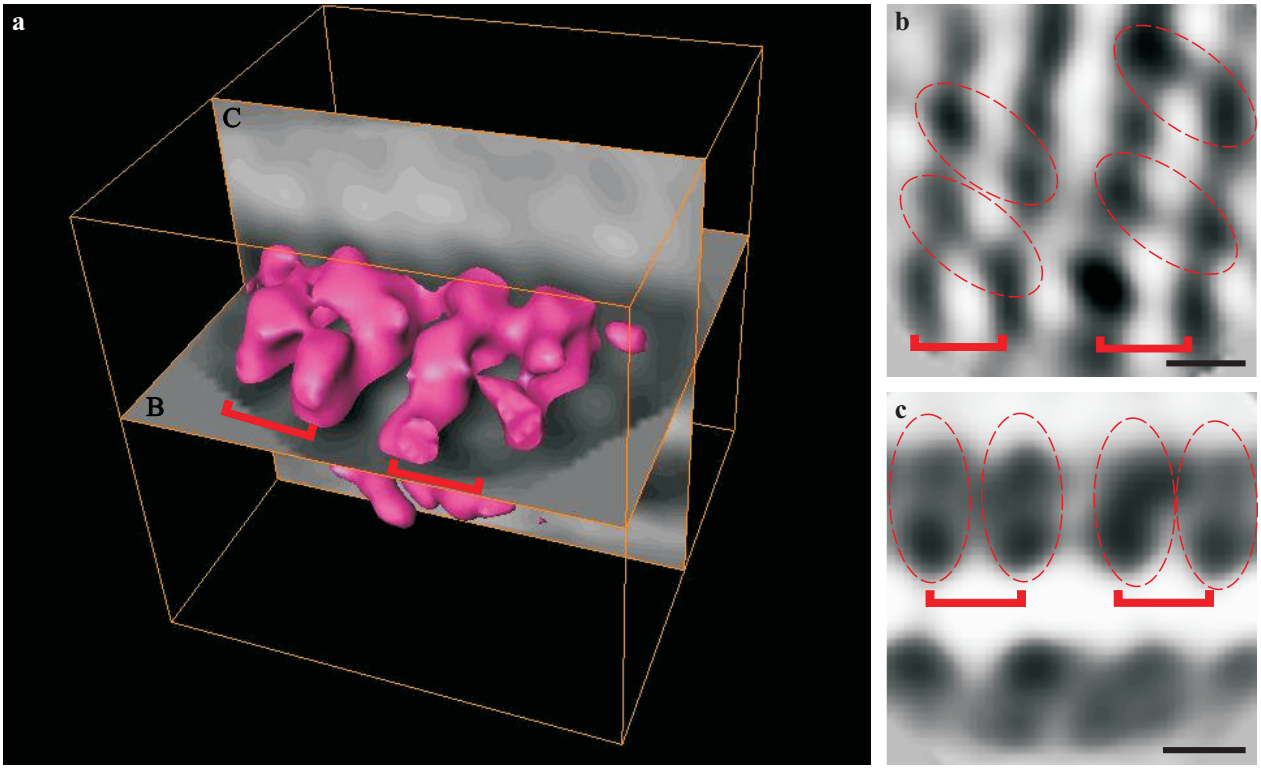


Abbildung 2: Organisation des Rhodospins in der intakten Membran. a. 3D-Rekonstruktion von Rhodopsin (pink) in der *Disk*-Membran. Einzelne Rhodopsinmoleküle werden durch die Mittelwertbildung sichtbar. Hier sind zwei Reihen von Rhodopsin-Dimeren gezeigt (rote Klammern). **b, c.** Virtuelle Schnitte durch das rekonstruierte Volumen aus a. **b.** Schnitt parallel zur *Disk*-Membran (Ebene B in a) zeigt zwei Reihen (rote Klammern) in denen die Rhodopsin-Dimere (rote Ellipsen) und sogar die einzelnen Rhodopsin-Moleküle sichtbar sind. **c.** Querschnitt durch eine *Disk* (Ebene C in a), beide Membranen sind sichtbar. In der oberen Membran sind Rhodopsin-Monomere (rote Ellipsen) erkennbar, die Dimere (rote Klammern) bilden.

Druck (~2000 bar; zum Vergleich: der „normale" Luftdruck beträgt 1 bar) nicht ausdehnen. Stattdessen verwandelt es sich in eine glasartige, amorphe, viskose Flüssigkeit; das Gewebe bleibt dabei sehr gut erhalten. Nach dem Einfrieren werden die Proben in 20-50 nm dünne Scheibchen geschnitten und im Transmissions-Elektronenmikroskop untersucht. Das Transmissions-Elektronenmikroskop liefert zunächst nur zweidimensionale Bilder. Nimmt man aber – ähnlich wie in der medizinischen Computertomografie (CT) – Bilder aus verschiedenen Richtungen auf (*Tomogramm*), kann man die Einzelbilder später im Computer zu einer dreidimensionalen Darstellung des Schnittes zusammenfügen. Allerdings ist das Signal-Rausch-Verhältnis in Kryo-

Tomogrammen sehr gering, sprich: Das Signal ist zu schwach, das Rauschen zu groß. Deshalb sind zellulare Strukturen und Moleküle nicht gut sichtbar. In solchen Fällen hilft eine Nachbearbeitung. Der wichtigste Bearbeitungsschritt ist eine Mittelwertbildung von *Subtomogrammen*. Hierbei werden viele kleine *Tomogramme*, die nur wenige Rhodopsinmoleküle enthalten, aus dem großen *Tomogramm* ausgeschnitten und übereinander gelegt. Wenn man die Rhodopsin-Moleküle perfekt ausrichtet, verbessert man das Signal-Rausch-Verhältnis deutlich. Nach dieser Bildbearbeitung konnten wir einzelne Rhodopsin-Moleküle in der Membran erkennen (Abbildung 2). Und das ist erwähnenswert: Bislang war es weltweit noch niemandem gelungen, ein so kleines Molekül in einem intakten Gewebe sichtbar zu machen.

Deshalb konnten wir auch die Kontroverse klären, ob Rhodopsin Dimere bildet oder als Monomer vorliegt. Die Antwort: Es bildet Dimere! Zusätzlich haben wir herausgefunden, dass Rhodopsin sogenannte supramolekulare Strukturen ausbildet. Die Dimere sind in Reihen aus jeweils ca. 50 Molekülen angeordnet; je zwei Reihen lagern sich zu einer Doppelreihe zusammen (wie „Bahngleise"). Die Doppelreihen sind räumlich voneinander getrennt. Interessant ist auch die Anordnung der Doppelreihen innerhalb der *Disk*-Membran: Wie bereits erwähnt besitzt jedes *Disk* eine Einfaltung. Die Doppelreihen der Rhodopsin-Dimere sind parallel zu diesen Einfaltungen angeordnet. Unsere Ergebnisse haben wir in einem Modell illustriert (Abbildung 3).

Welcher physiologischen Funktion dient eine solche geometrische Anordnung? Darüber können wir im Moment nur spekulieren. Wir vermuten, dass die Rhodopsin-Doppelreihen funktionelle Einheiten darstellen: Auf den Rhodopsin-Gleisen werden Komponenten, die am Sehprozess beteiligt sind, räumlich organisiert und so „in Stellung gebracht". Eine solche Einheit könnte aus 50 Rhodopsin-Molekülen, drei *Transducin*-Molekülen und einem *Phosphodiesterase*-Molekül bestehen; die Signalmoleküle liegen in diesem Verhältnis in der *Disk*-Membran vor. Die *Transducin*-Moleküle passen auch von der Größe her genau in die Mulde zwischen zwei Dimer-Reihen. Diese Vororganisation hat den Vorteil, dass sich die Moleküle nicht erst finden müssten; sie wären alle schon perfekt zueinander ausgerichtet. Welchen Vorteil könnte es bringen, dass die Doppelreihen parallel zur Einfaltung angeordnet sind? Dies könnte die strukturelle Grundlage für Polarisationssehen sein. Was versteht man darunter? Einige

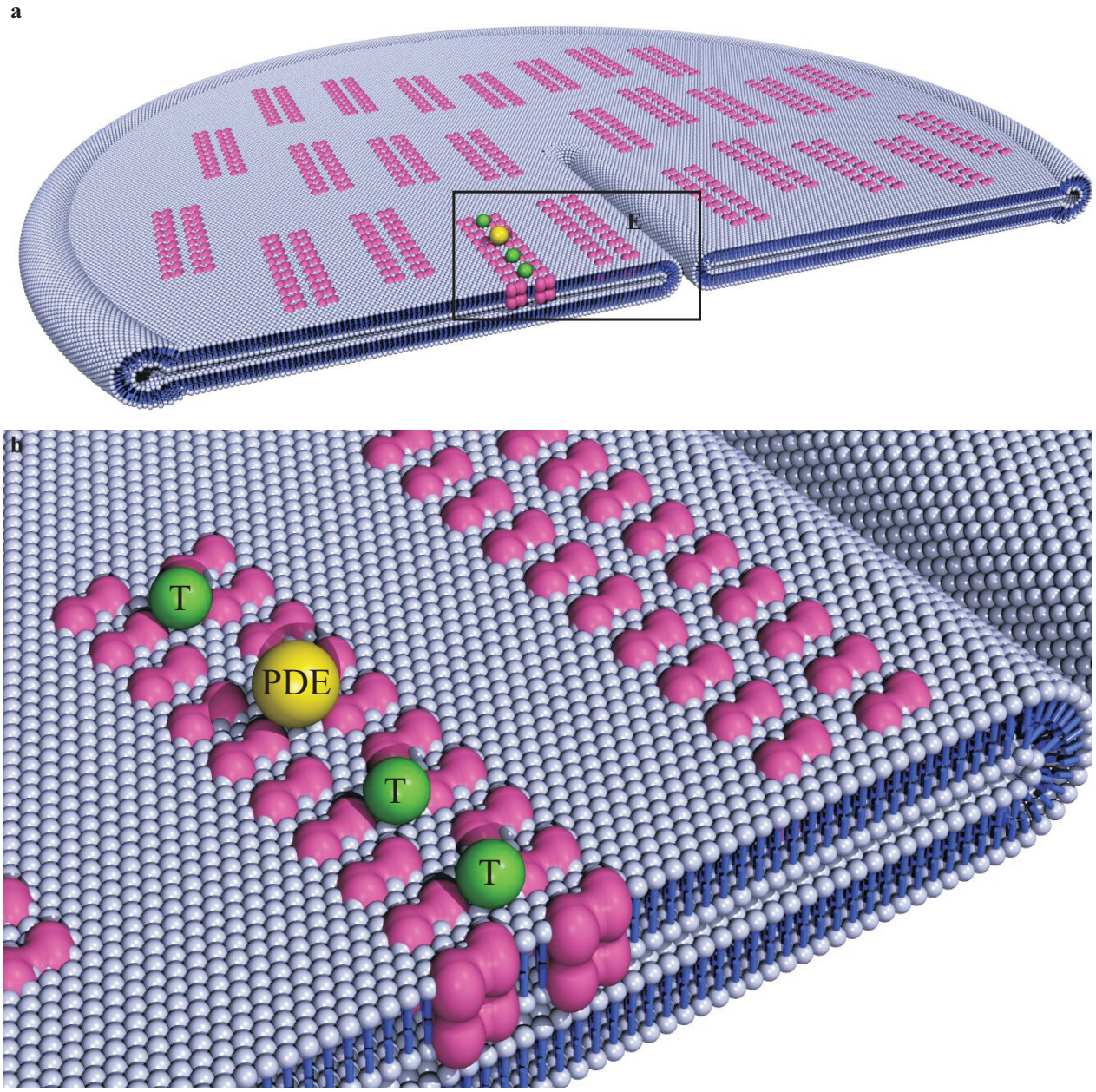


Abbildung 3: Modell der Rhodopsin-Organisation in der intakten *Disk*-Membran. a. Das Model zeigt einen Überblick über die Organisation des Rhodopsins (pink) in der *Disk*-Membran. Die Einfaltung (E) ist gekennzeichnet. **b.** Vergrößerung des markierten Ausschnitts von a. Die Organisation in Dimere, Reihen aus Dimeren und Doppelreihen wird deutlich. Schematisch sind ein *Phosphodiesterase*-Molekül (PDE) und *Transducin*-Moleküle (T) eingefügt.

Tiere, vornehmlich Insekten, orientieren sich, indem sie die Polarisation des Lichtes (also die Ebene, in der die Lichtwellen schwingen) detektieren. Dazu müssen die Sehpigmente, die das Licht absorbieren, alle ausgerichtet vorliegen; nur so ist die Sensitivität für eine Polarisationsrichtung groß genug. Der hohe Ordnungsgrad, mit der das Rhodopsin in den Sehstäbchen der Maus vorliegt, könnte Polarisationssehen ermöglichen. Allerdings ist die Polarisationsempfindlichkeit bei Säugetieren umstritten [4]. Bisher wurde Polarisationssehen vorwiegend bei Insekten, Amphibien und bei einigen Fischen nachgewiesen. Vielleicht stimulieren unsere Ergebnisse ja weiterführende Untersuchungen zum Polarisationssehen von Säugetieren.

Ausblick:
Obwohl wir die Kontroverse über die Organisation von Rhodopsin geklärt haben, können wir nicht erklären, warum frühere verlässliche Arbeiten gezeigt haben, dass Rhodopsin sich um sich selber dreht und auf der *Disk*-Oberfläche herumwandert. Unsere Experimente werden darauf ausgerichtet sein, diesen Widerspruch aufzuklären.

Literatur

[1] Lohse, M. J. (2010) "Dimerization in GPCR mobility and signaling" *Curr. Opin. Pharmacol.* 10, 53-58

[2] Chabre, M. & le Maire, M. (2005) "Monomeric G-protein-coupled receptor as a functional unit" *Biochemistry* 44, 9395-9403

[3] Palczewski, K. (2010) "Oligomeric forms of G-protein-coupled receptors (GPCRs)" *Trends in biochemical sciences* 35, 595-600

[4] Horvàt, G. & Varju, D. (2004) "Polarized light in animal vision". *Polarization patterns in nature.* Springer.

Basic principles for gradient sensing

Luis Alvarez

Kontakt
Dr. Luis Alvarez
Forschungszentrum caesar
Abteilung Molekulare Neurosensorik
Telefon: (0228) 9656-354
luis.alvarez@caesar.de

For some animals living in the sea, fertilization does not require that males and females meet. Instead, both genders release their gametes into the seawater and leave them on their own. The ocean is vast. To increase the chances that gametes encounter each other, eggs of many species release molecules ("chemoattractants"); these molecules serve as signposts for sperm to locate the egg. Sperm can "read" or measure the spatial distribution of chemoattractant molecules and adjust their swimming path accordingly. How do sperm accomplish this task?

Sperm of the sea urchin *Arbacia punctulata* swim on a circular path. In a chemoattractant gradient, owing to the circular movement, sperm are exposed to a periodic stream of chemoattractant molecules that impinge on their flagellum and bind to their cognate receptors. The periodic stimulation is translated by a cellular signalling pathway into Ca^{2+} oscillations that control the steering response and guide sperm to the egg. Although the basics underlying chemotaxis have been unfolded, fundamental questions still await a definitive answer: For how long do sperm sample a chemical gradient before they respond? What happens when additional molecules are delivered during an ongoing Ca^{2+} signal or steering response? How do sperm cope with the large range of concentrations that they encounter during their sojourn? Do sperm adjust their sensitivity? From how far away can eggs attract sperm?

Cells or whole organisms employ two different strategies to find out where to go. They measure the chemoattractant concentration along their body (*spatial sampling*) or they measure the concentration at two different time points while moving in the gradient (*temporal sampling*). Spatial sampling is favorable for large cells moving slowly, whereas temporal sampling is favorable for small and fast moving cells. Sperm are large (roughly 50 µm) and move fast (100 - 200 µm/s), thus it is not obvious, which sampling strategy they follow. Our work shows that sperm, in fact, use a temporal mechanism; they sample the chemoattractant for a period of 0.2 - 0.6 seconds, before a Ca^{2+} signal is produced. During this sampling period, sperm swim about one body

length; this is an optimal compromise between spatial precision and sensitivity.

A second fundamental question that we addressed is: What happens when a sperm cell made a decision, initiated a cellular response, and then receives a new chemotactic stimulus? Intuitively, one would predict that the second stimulus will reinforce the ongoing cellular response. However, we observed a different, quite unexpected result: sperm terminate the ongoing Ca^{2+} response and then initiate a new one (Figure 1). In other words, the cell resets its cellular program, like a computer. During resetting of the Ca^{2+} signal, sperm straighten their swimming path and thereby prolong their swimming up the gradient.

A third question that we addressed is: How can sperm reconcile a wide dynamical range with sensitivity at the physical limit of quantal detection? Sperm are exquisitely sensitive and can respond to a single chemoattractant molecule. Sperm can even count single molecules delivered in succession to produce a sum response. While sperm approach the egg, they are exposed to an ever increasing concentration of chemoattractant. By exposing sperm to different

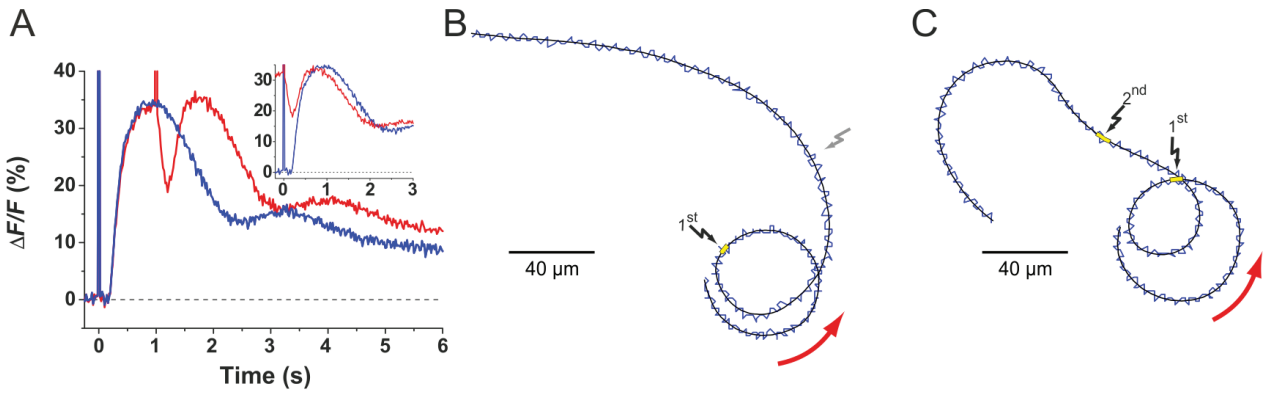


Figure 1: A second stimulus produces a Ca^{2+} drop followed by a new Ca^{2+} rise. A. Ca^{2+} signals evoked by one stimulus (blue) or two different stimuli one second apart (red). Inset: The second Ca^{2+} signal was shifted by one second to the left and superposed on the first Ca^{2+} signal. **B. and C.** Representative swimming paths from individual cells after receiving a single stimulus (B, yellow box and black arrow) or two stimuli 800 ms apart (C, yellow boxes and black arrows). The sperm head (blue trace) wiggles around the average path (black trace); red arrow indicates the swimming direction. After the second flash (C), the swimming path transiently bent in a clockwise direction, whereas the control cell swam undeviated (B, grey arrow).

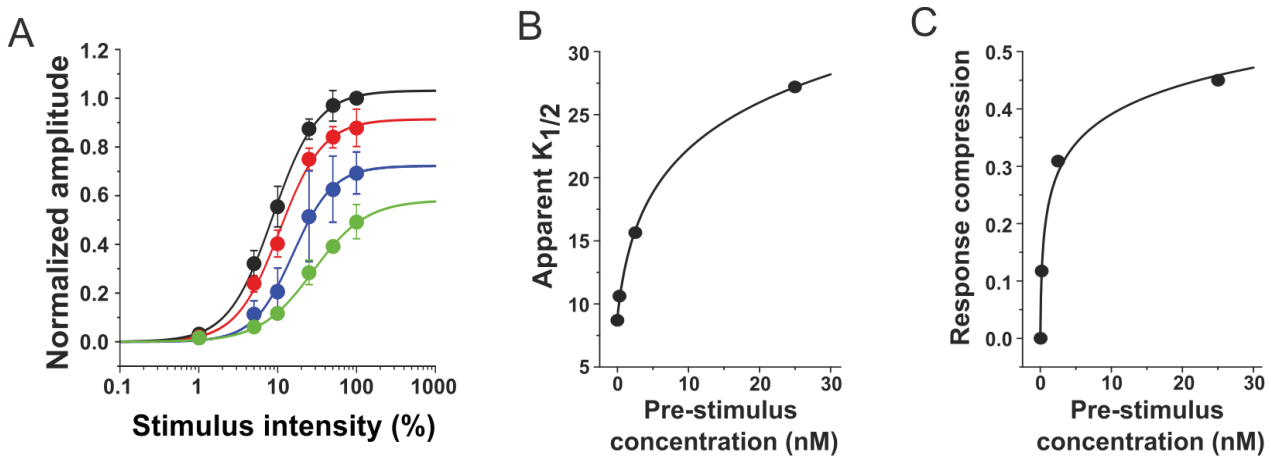


Figure 2: Adaptation of Ca^{2+} signals. A. Shift in the dynamic range of Ca^{2+} signals. Test stimuli were delivered either in the absence (black) or presence of adapting chemoattractant (in nM): 0.25 (red), 2.5 (blue), and 25 (green). Ca^{2+} signal amplitudes produced by a test stimulus were plotted. **B.** Apparent $K_{1/2}$ and **C.** response compression at different background concentrations.

background levels of the attractant and testing their sensitivity, we show that sperm escape saturation by adjusting their sensitivity; they shift the sensitivity range to higher chemoattractant concentrations and compress the Ca^{2+} signal (Figure 2).

Although sperm chemotaxis has been studied for a century, it is unknown how far the gradient reaches out to attract sperm. We calculated the spatial distribution of the chemoattractant concentration in time and estimated a distance of 4.7 mm from which eggs attract sperm. While this distance does not seem to be impressive, it increases the "effective" volume of the egg to capture sperm by many orders of magnitude (Figure 3).

Our work provides fundamental insights about gradient sensing. Many microorganisms explore gradients along periodic paths and translate the spatial distribution of the stimulus into a temporal pattern of cell responses. The basic principles outlined here - temporal sampling, resetting, and adaptation - might control gradient sensing in other organisms and cells as well.

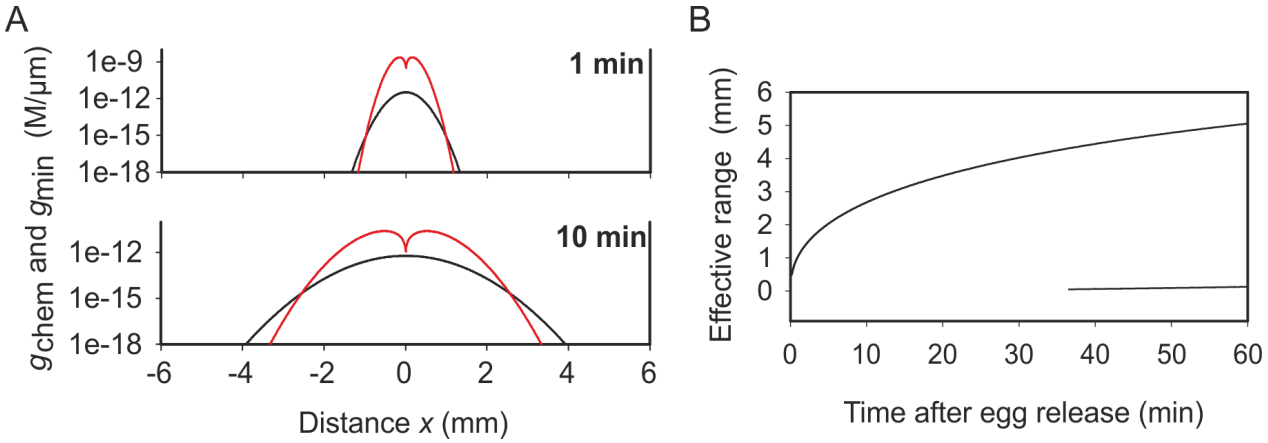


Figure 3: Range of sperm attraction. A. Chemoattractant gradient (g_{chem}; black) and the estimated minimal gradient to attract sperm (g_{min}; red) for 1 or 10 minutes after egg release. For the effective range of sperm attraction, the chemoattractant gradient must be larger than g_{min}. **B.** Effective range of sperm attraction vs. time after egg release. At t > 30 min, $g_{chem} < g_{min}$ in the very vicinity of the egg. Hence, we observe two boundaries, a short one and a long one for the effective gradient.

Literatur

[1] Kashikar, N., Alvarez, L., Seifert, R., Gregor, I., Jäckle, O., Beyermann, M., Krause, E. & Kaupp, U. B. (2012) "Temporal sampling, resetting, and adaptation orchestrate gradient sensing in sperm" *J. Cell. Biol.* 198, 1075-1091

[2] Mitch, L. (2012) "Unlocking the sperm's internal compass" *J. Cell Biol.* 198, 955

GBA2 – Ein neuer Ansatzpunkt zur Therapie von *Morbus Gaucher* – einer Fettstoffwechselkrankheit

Heinz G. Körschen und Dagmar Wachten

Kontakt
Dr. Heinz G. Körschen
Forschungszentrum caesar
Abteilung Molekulare Neurosensorik
Telefon: (0228) 9656-272
h.g.koerschen@caesar.de

***Morbus Gaucher* ist eine Erbkrankheit, bei der sich vor allem in Leber und Milz, aber auch in Nervenzellen Fettstoffe anreichern. Das betroffene Gen kodiert für das Enzym beta-Glukosidase 1 (GBA1). GBA1 baut das Fettstoffwechselprodukt Glukosylceramid zu Glukose und Ceramid ab. Bei *Morbus Gaucher*-Patienten ist die Aktivität von GBA1 vermindert. Wir konnten zeigen, dass bei diesen Patienten auch die Aktivität einer weiteren beta-Glukosidase – GBA2 – beeinträchtigt ist. Der Abbau des Glukosylceramids wird dadurch weiter eingeschränkt und die Fettanreicherung verstärkt. GBA2 könnte deshalb den Verlauf von *Morbus Gaucher* beeinflussen und einen neuen Angriffspunkt für Medikamente bieten.**

Komplexe Sphingolipide sind wichtige Bestandteile der Zellwand, insbesondere unserer Haut-, Nerven- und Blutzellen. Sphingolipide werden durch Anfügen mehrerer Zuckermoleküle an Glukosylceramid synthetisiert, das als Vorstufe für mehr als 400 verschiedene, komplexe Sphingolipide dient [1]. Glukosylceramid wiederum entsteht entweder durch Neusynthese, bei der UDP-Glukose mit Ceramid verknüpft wird, oder aber durch den Abbau komplexer Sphingolipide (Abbildung 1). Die beta-Glukosidasen GBA1 und GBA2 können Glukosylceramid wieder in Glukose und Ceramid spalten (Abbildung 1). GBA1 verrichtet ihre Arbeit normalerweise in Lysosomen, den „Verdauungsorganellen" von Zellen. Ist GBA1 durch einen Gendefekt inaktiv, reichern sich Sphingolipide und Glukosylceramid in Lysosomen an. Leber oder Milz schwellen um ein Vielfaches an: Die lysosomale Speicherkrankheit *Morbus Gaucher* beginnt.

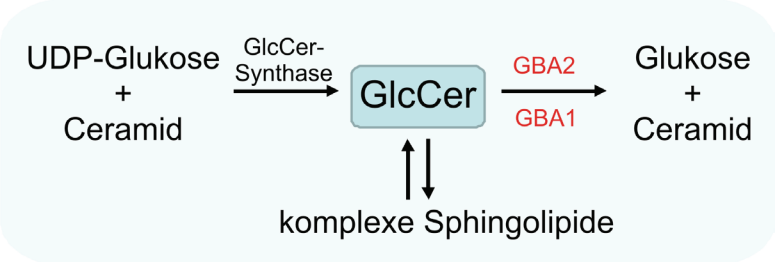


Abbildung 1: Glukosylceramid (GlcCer)-Metabolismus.

In schweren Fällen der Krankheit sterben die Patienten bereits in jungem Alter. *Morbus Gaucher* wird autosomal-rezessiv vererbt, d.h. männliche und weibliche Patienten sind gleichermaßen häufig betroffen und tragen den Defekt in beiden Genkopien ihres Erbgutes. Ein solcher Defekt tritt bei einer von ca. 20.000 Personen auf, also verhältnismäßig selten. In manchen kleineren ethnischen Bevölkerungsgruppen erkrankt jedoch jeder Hundertste an *Morbus Gaucher*. Die zweite beta-Glukosidase - GBA2 - kommt überdurchschnittlich häufig in Leber, Hoden und Gehirn vor [2]. Ein defektes GBA2-Gen beeinträchtigt die Regenerationsfähigkeit der Leber und die Entwicklung der Spermien.

Wenn man das GBA2-Gen in Mäusen ausschaltet, reichert sich Glukosylceramid auch außerhalb der Lysosomen an [2]. Wo genau GBA2 in der Zelle lokalisiert ist, war bislang nicht zweifelsfrei geklärt. Mit Hilfe immunologischer Methoden konnten wir zeigen, dass sich GBA2 außen an den Golgi-Apparat und das endoplasmatische Retikulum anlagert – also genau dort, wo auch das Substrat für die GBA2 vorkommt (Abbildung 2) [2; 3].

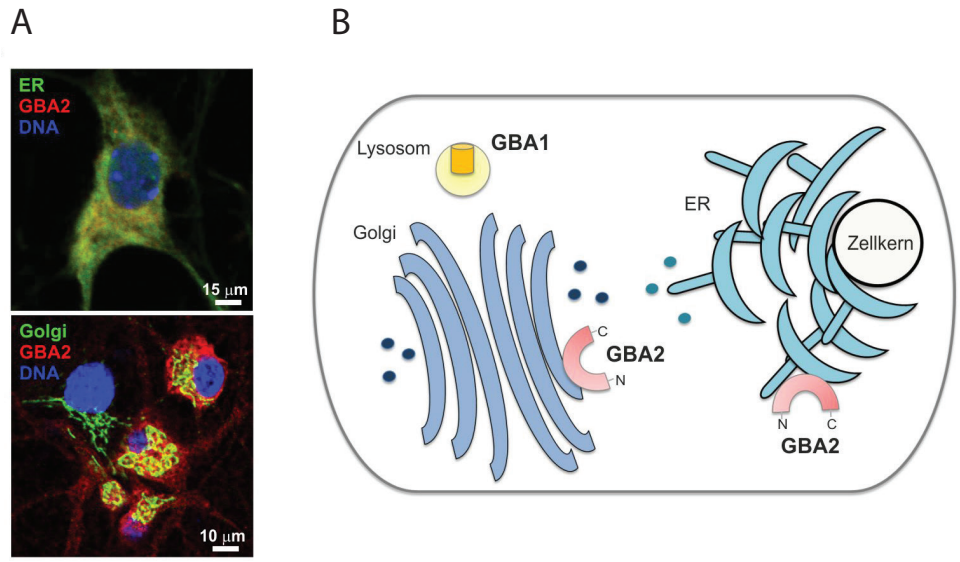


Abbildung 2: GBA2 lagert sich außen an das endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat an. A. Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie haben wir GBA2 (rot) in Nervenzellen lokalisiert. Die Bereiche, in denen sich GBA2 am endoplasmatische Retikulum (ER, grün, oben) oder am Golgi-Apparat (Golgi, grün, unten) befindet, sind gelb gefärbt. Der Zellkern ist in blau angefärbt. **B.** GBA1 befindet sich in Lysosomen, GBA2 auf der zytoplasmatischen Seite des ER und des Golgi-Apparates.

Wir haben ein neues Analyseverfahren (Assay) entwickelt, um die Aktivität von GBA1 und GBA2 zuverlässig voneinander unterscheiden zu können. Ein Assay, der seit 40 Jahren zur Analyse der GBA1-Aktivität in Zellextrakten verwendet wird, eignet sich dazu nicht [3]. Dieser Assay wird bei leicht saurem pH-Wert (pH 5,5) in Gegenwart von Detergenzien durchgeführt. In Lysosomen, wo GBA1 zu finden ist, herrscht ein saures Milieu (pH 4); GBA2 im Zytosol hingegen befindet sich in einer Umgebung mit neutralem pH. Detergenzien verschieben die pH-Abhängigkeit der GBA1-Aktivität zu höheren und die der GBA2-Aktivität zu niedrigeren pH-Werten. Dadurch überlappen die Aktivitätsprofile von GBA1 und GBA2 miteinander; eine Trennung der beiden ist nahezu unmöglich. Wir haben deshalb einen Assay ohne Detergenzien entwickelt und die GBA1- und GBA2-Aktivität bei unterschiedlichen pH-Werten untersucht (Abbildung 3) [4].

Mit Inhibitoren der GBA1 oder GBA2 konnten wir zeigen, dass der neue Assay beide Enzymaktivitäten sauber trennt. Mehr noch, ohne Detergenzien ist die GBA2-Aktivität wesentlich höher als in Gegenwart von Detergenzien. Die GBA2-Aktivität wurde also in früheren Assays deutlich unterschätzt.

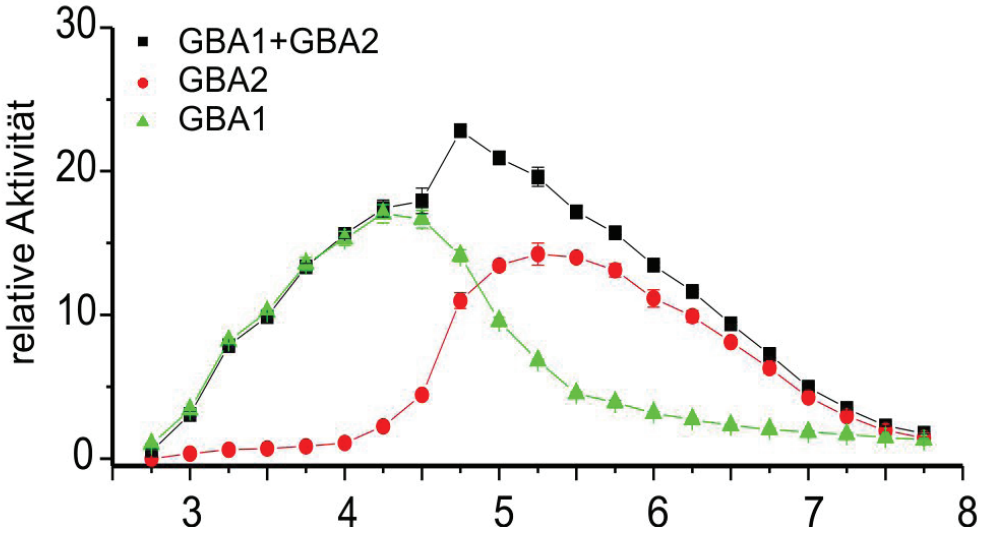


Abbildung 3: Ein neuer Assay zur Unterscheidung der GBA1- und GBA2-Aktivität. Die pH-Profile zeigen, dass GBA1- und GBA2-Aktivitäten mit dem neuen Assay deutlich voneinander getrennt werden können. Der optimale pH-Wert zur Bestimmung der GBA1-Aktivität liegt bei pH 4, für GBA2 bei pH 6.

Wir haben den neuen Assay eingesetzt, um die GBA1- und GBA2-Aktivität in *Morbus Gaucher*-Patienten zu bestimmen. *Morbus Gaucher* kann unterschiedlich verlaufen: Manche Patienten zeigen nur milde Symptome, andere hingegen sind schwer behindert oder sterben. Welche Faktoren neben dem defekten GBA1-Gen den Krankheitsverlauf bestimmen, ist unklar. Wir vermuteten, dass bei *Morbus Gaucher*-Patienten auch die GBA2-Aktivität beeinträchtigt sein könnte, was die Anreicherung von Glukosylceramid verstärken würde. Wir haben deshalb die GBA1- und GBA2-Aktivität in Hautzellen von *Morbus Gaucher*-Patienten untersucht: Patienten mit geringer GBA1-Aktivität zeigten auch eine geringere GBA2-Aktivität (Abbildung 4).

Ähnliches beobachteten wir in Hautzellen von Mäusen, in denen das Gba1-Gen ausgeschaltet worden war – auch hier ist die GBA2-Aktivität reduziert. Wir vermuten deshalb, dass die beiden Enzyme miteinander wechselwirken. Der zugrunde liegende molekulare Mechanismus ist jedoch unbekannt.

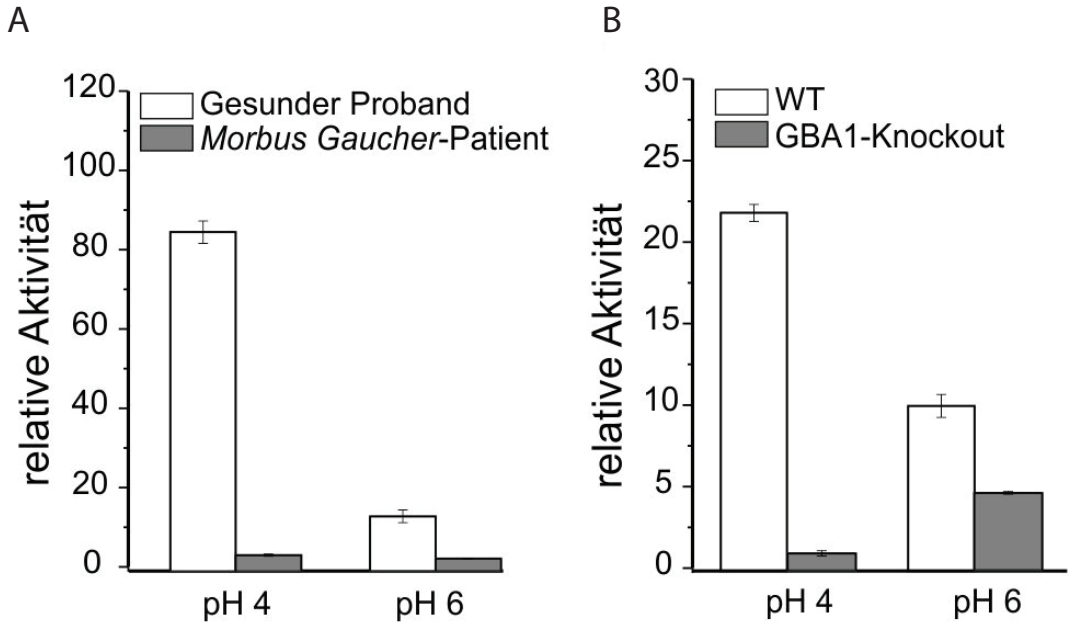


Abbildung 4: Glukosidase-Aktivität in einem Morbus Gaucher-Patienten und in GBA1-Knockout Mäusen. A. Die GBA1- und GBA2-Aktivität in Hautzellen (Fibroblasten) eines gesunden Probanden und eines *Morbus Gaucher*-Patienten. **B.** GBA1- und GBA2-Aktivität in embryonalen Fibroblasten von Wildtyp-Mäusen und von Mäusen, in denen das *Gba1*-Gen ausgeschaltet worden war (GBA1-Knockout).

GBA2 scheint also eine weitaus wichtigere Rolle im Fettstoffwechsel zu spielen als bislang angenommen. Möglicherweise bietet GBA2 sogar einen neuen Ansatzpunkt zur Therapie des *Morbus Gaucher*.

Literatur

[1] Lahiri, S. & Futerman, A. H. (2007) "The metabolism and function of sphingolipids and glycosphingolipids" *Cell. Mol. Life Sci.* 64, 2270-2284

[2] Yildiz, Y., Matern, H., Thompson, B., Allegood, J. C., Warren, R. L., Ramirez, D. M., Hammer, R. E., Hamra, F. K., Matern, S. & Russell, D. W. (2006) "Mutation of beta-glucosidase 2 causes glycolipid storage disease and impaired male fertility" *J. Clin. Invest.* 116, 2985-2994

[3] van Weely, S., Brandsma, M., Strijland, A., Tager, J. M. & Aerts, J. M. (1993) "Demonstration of the existence of a second, non-lysosomal glucocerebrosidase that is not deficient in Gaucher disease" *Biochim. Biophys. Acta* 1181, 55-62

[4] Körschen, H. G., Yildiz, Y., Raju, D. N., Schonauer, S., Bönigk, W., Jansen, V., Kremmer, E., Kaupp, U. B. & Wachten, D. (2013) "The non-lysosomal β-Glucosidase GBA2 is a non-integral membrane-associated protein at the endoplasmic reticulum (ER) and golgi" *J. Biol. Chem.* 288, 3381-3393

Wie man Flüssigkeiten mischt – oder auch nicht

Siegfried Steltenkamp und Manfred Lacher

Kontakt
Dr. Siegfried Steltenkamp
Forschungszentrum caesar
Projektgruppe Mikrosystemtechnologie
Telefon: (0228) 9656-371
siegfried.steltenkamp@caesar.de

Flüssigkeiten vermischen sich fast wie von selbst – und das sehr schnell. Das sehen wir jeden Morgen, wenn wir Milch in den Kaffee gießen. In der mikroskopischen Welt ist das anders: Auf kleinstem Raum können zwei Flüssigkeiten einige Zeit nebeneinander fließen, bevor sie sich dann langsam vermischen. Diesen Effekt machen wir uns zunutze: Wir entwickeln einen Mikromischer, der einen zeitlich und räumlich stabilen Konzentrationsgradienten erzeugen kann. Damit kann man beispielsweise das Verhalten von Spermien in Lockstoffgradienten untersuchen.

Spermium sucht Eizelle – Wie kann man das im Labor nachstellen?

Spermien haben einen weiten Weg vor sich, um zur Eizelle zu gelangen. Die Eizelle unterstützt die Spermien auf ihrer Suche und sendet Lockstoffe aus. Beim Seeigel lockt ein kurzes Protein namens *Resact* die Spermien an. In der Nähe der Eizelle ist die Lockstoffkonzentration am höchsten. Mit zunehmender Entfernung nimmt die Konzentration kontinuierlich ab. Das Spermium orientiert sich an diesem Konzentrationsgefälle – einem sogenannten Gradienten. Der Lockstoff bewirkt, dass Kalzium in das Spermium einströmt. Das Kalzium ändert den Flagellenschlag und damit die Schwimmrichtung des Spermiums [1]. Das gerichtete Schwimmen der Spermien hin zur Lockstoffquelle nennt man *Spermien-Chemotaxis*. Die zugrundeliegenden biochemischen Vorgänge versteht man beim Seeigel schon gut. Doch einige grundlegende Fragen sind noch nicht geklärt (siehe Bericht von Luis Alvarez im vorliegenden Jahresbericht). Um die offenen Fragen zu beantworten, muss man im Labor die chemische Umgebung der Eizelle exakt nachbilden und zeitlich stabile Konzentrationsgradienten erzeugen. Bislang existierte keine geeignete Methode, mit der stabile Lockstoffgradienten gebildet werden können, ohne dass die Spermien einem Fluss ausgesetzt sind. Ein solcher Fluss würde verhindern, dass sich die Spermien im Gradienten frei bewegen können und nur von den Konzentrations-unterschieden geleitet werden. Wir sind nun in der Lage, mit Hilfe der Mikrofluidik stabile Gradienten ohne Fluss herzustellen.

Mikrofluidik – eine Welt ohne Turbulenzen

Bei vielen Menschen beginnt der Tag mit einer Tasse Kaffee. Gibt man Zucker in den Kaffee, so sinkt er auf den Boden der Tasse. Die Zuckerkonzentration im Kaffee ist also am Boden hoch und an der Oberfläche niedrig. Es entsteht ein Zuckergradient! Wir Kaffeetrinker möchten aber keinen Zuckergradienten, sondern einen gleichmäßig gesüßten Kaffee. Um den Gradienten auszugleichen, rühren wir mit einem Löffel in der Tasse herum. Es werden makroskopische Verwirbelungen erzeugt, sogenannte Turbulenzen, die den Zucker vermischen. Bei dem Einschütten der Milch entstehen solche Turbulenzen automatisch und vermischen den Kaffee und die Milch.

In der mikroskopischen Welt kommen Turbulenzen kaum vor. Mit dieser mikroskopischen Welt beschäftigt sich die Mikrofluidik. Dort untersucht man das Verhalten von Flüssigkeiten und Gasen auf kleinstem Raum. In der Mikrofluidik beobachtet man Effekte, die in der klassischen Strömungslehre oft vernachlässigt werden können. Zum Beispiel dominieren Reibungskräfte oder Kapillarkräfte gegenüber der Trägheit- oder Gravitationskraft. So entstehen Bewegungen, bei denen keine Turbulenzen auftreten – sogenannte laminare Flüsse. In einem laminaren Fluss vermischen sich Flüssigkeiten und Gase nicht durch Turbulenzen, sondern nur durch Diffusion. Unter Diffusion versteht man die Zufallsbewegung von kleinen Teilchen. Bei ungleichmäßiger Verteilung bewegen sich mehr Teilchen aus Bereichen hoher Teilchendichte in Bereiche geringer Teilchendichte als umgekehrt. Dies führt mit der Zeit zur vollständigen homogenen Durchmischung der Teilchen.

Auf Flüssigkeiten übertragen heißt das: Je höher die Diffusion ist, desto schneller durchmischen sich die Flüssigkeiten. Hierbei ist nicht wichtig, ob es sich um unterschiedliche, mischbare Flüssigkeiten oder um eine Flüssigkeit mit verschiedenen Konzentrationen eines gelösten Stoffes handelt. Die Durchmischung hängt davon ab, wie lange die Flüssigkeiten in Kontakt stehen. Je länger, desto besser vermischen sie sich. Um die Kontaktzeit zu verändern, können wir an zwei Schrauben drehen: an der Länge der Flussstrecke und an der Flussgeschwindigkeit. Wir können Flüssigkeiten entweder durch eine lange Kontaktzeit vermischen oder sie durch eine kurze Kontaktzeit

nebeneinander fließen lassen. Diese Möglichkeit nutzen wir, um einen Mikromischer zu entwickeln: Zunächst vermischen wir die Flüssigkeiten und nutzen den Fluss zur Erzeugung der gewünschten Konzentrationsstufen. Danach lassen wir die Konzentrationen nebeneinander fließen und stoppen den Fluss für die Untersuchung der Spermien-Chemotaxis.

Aufbau des Gradientenmischers

Der Mikromischer besteht aus drei Abschnitten (Abbildung 1). Im ersten Abschnitt befinden sich die Einlässe. Im zweiten Abschnitt erhöht man die Konzentrationsstufen schrittweise und gibt den Flüssigkeiten der verschiedenen Konzentrationen in mäanderförmigen Mischkanälen genug Zeit, um sich gut zu vermischen. Ein Mäander ist eine eng anliegende Flussschlinge.

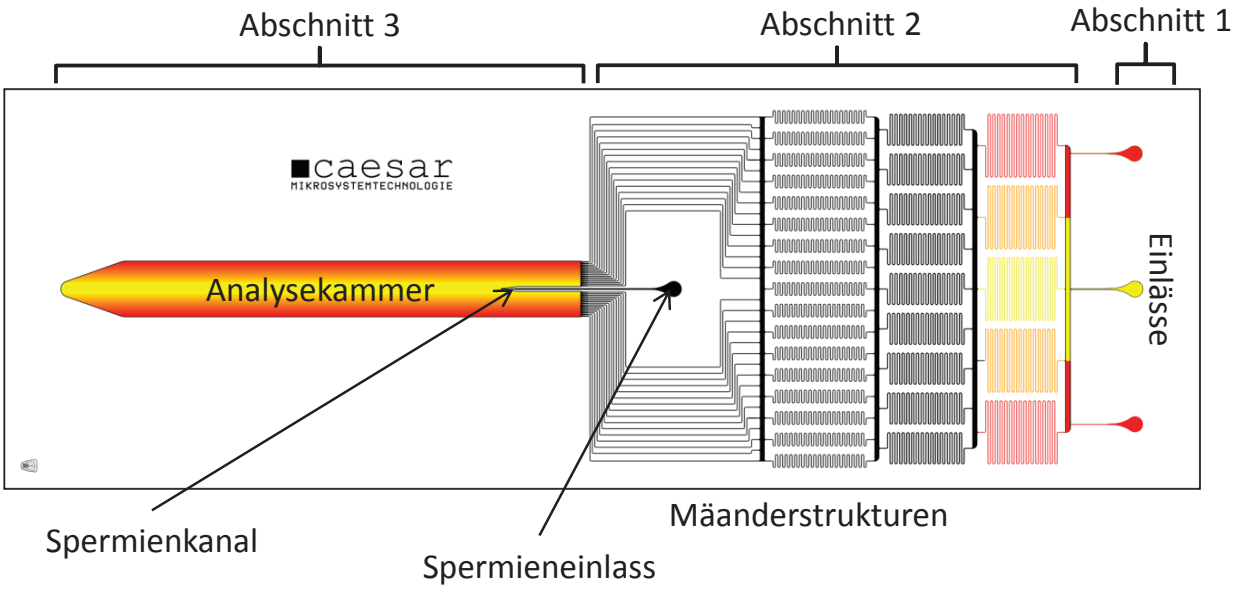


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Gradientenmischers. Der Gradientenmischer unterteilt sich in drei Abschnitte: die Einlässe, die Mäanderstrukturen und die Analysekammer. In den Mäanderstrukturen werden die unterschiedlichen Konzentrationen aus den Ursprungskonzentrationen (rot und gelb) gemischt und in die Analysekammer geleitet. Die Analysekammer hat eine Fläche von 3,5 x 29 mm^2. Der 0,1 mm breite Spermienkanal wird 5 mm in die Analysekammer geführt.

Das Vorgehen kann man mit dem Farbenmischen vergleichen: Aus zwei gleich hoch gefüllten Eimern mit den Farben rot und gelb kann man drei gleich hoch gefüllte Eimer mit den Farben rot, gelb und der Mischfarbe orange erzeugen, indem man jeweils ein Drittel der roten und gelben Farbe in einen dritten Eimer füllt. Man muss den Eimer mit der Rot-Gelb-Mischung aber lange Zeit umrühren, bevor man einen gleichmäßigen Orangeton erhält. Feinere Farbnuancen erhält man dann durch Vermischen von Orange mit Rot oder Gelb – und erneutes Umrühren. Wir vermischen in den Mäandern die „Farben" zu feineren Nuancen. Dann werden sie in sogenannten Ausgleichskanälen zusammengeführt. Hier werden die „Farben" wiederum auf mehrere Mäander gleichmäßig verteilt. Die Funktion des Ausgleichskanals ist vergleichbar mit einem „Druckausgleichspanel" in der Lüftungstechnik. Zu einer völligen Vermischung aller Konzentrationen kommt es in den Ausgleichskanälen nicht – dank der Mikrofluidik! Durch das Zusammenführen und das gleichmäßige Verteilen wird die Anzahl der Konzentrationsstufen erhöht.

Das Ganze lässt sich so weiterführen und man erhält immer mehr Verzweigungen, also auch mehr Konzentrationsstufen. Die Flussgeschwindigkeit nimmt mit wachsender Anzahl an Verzweigungen ab. Somit kann die Länge der Mäander reduziert werden, ohne die Kontaktzeit zu verkleinern. Das spart viel Platz! Der dritte Abschnitt umfasst die Analysekammer. In die Analysekammer münden die Auslässe der Mäanderstrukturen. Es bildet sich dort ein Konzentrationsgradient, in den die Spermien über einen weiteren Kanal injiziert werden.

Technologische Umsetzung

Der Mikromischer wird mit Hilfe mikrotechnologischer Methoden hergestellt; Fotolithographie-, Oxidations-, Bond- und Ätzprozesse wechseln sich ab. Die Herstellung lässt sich in vier grundlegende Schritte einteilen (Abbildung 2).

Während der Herstellung wird der Gradientenmischer auf Defekte und Fehlstellen kontrolliert. Abbildung 3 zeigt eine solche Kontrollaufnahme. Deutlich sind die geätzten Kanäle, Mäanderstrukturen und Ausgleichskanäle sowie die Auslässe zu sehen.

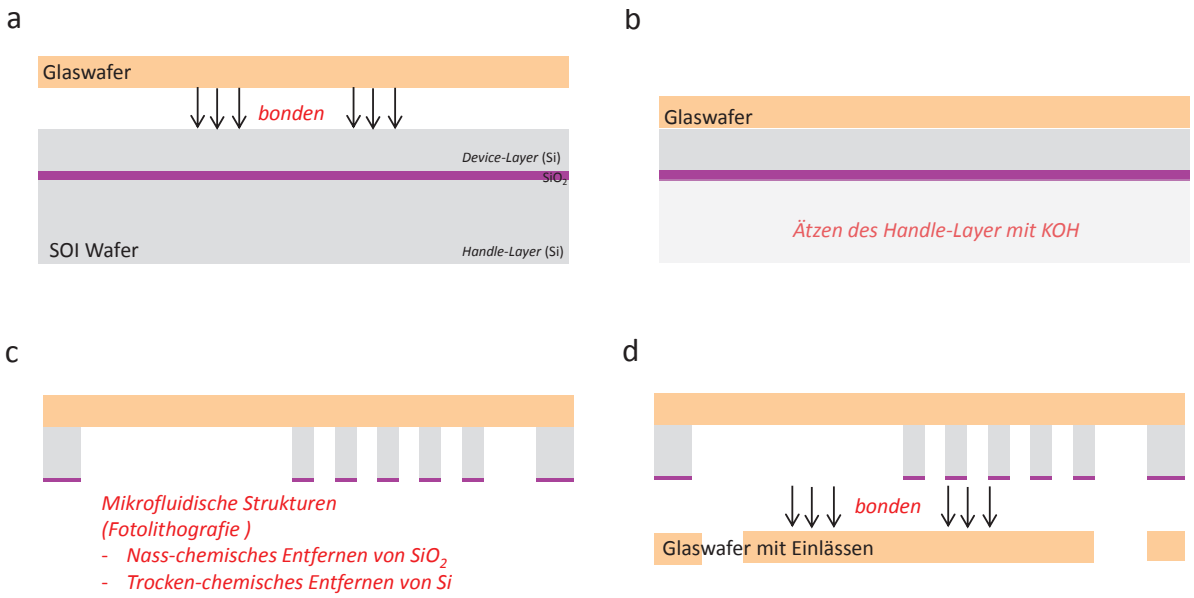


Abbildung 2: Schematische Querschnittsbilder des Herstellungsprozesses (vereinfacht). a. Grundlage ist ein SOI Wafer (*Silicon-on-insulator*): Auf einem Wafer aus Silizium (*Handle-Layer*) befinden sich eine Siliziumoxidschicht (*Insulator*) und darüber eine dünne Siliziumschicht (*Device-Layer*). Auf diesen Wafer wird ein Glaswafer anodisch gebondet: Hierbei werden die beiden Wafer auf etwa 400° C erwärmt. Durch die Erwärmung können sich die im Glas befindlichen Ionen freier bewegen. Wird nun eine äußere Spannung angelegt, so wandern die Ionen. Die Platten laden sich unterschiedlich auf und ziehen sich an, bis die Oberflächenatome des Glases mit denen des Siliziums chemisch reagieren können. **b**. Der *Handle-Layer* wird nasschemisch entfernt. **c.** Die Struktur des Gradientenmischers wird von der Unterseite aus in die Siliziumoxid-Schicht und den *Device-Layer* geätzt. **d.** Wiederum wird ein Glaswafer mit den entsprechenden Ein- und Auslässen anodisch gebondet, dieses Mal jedoch von der Unterseite.

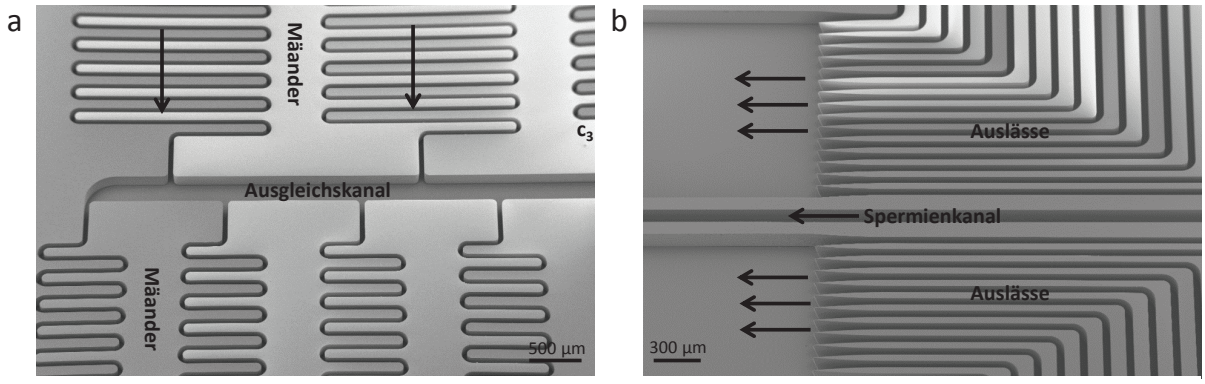


Abbildung 3: REM-Aufnahmen der Kanalstrukturen im Silizium-Wafer. Die Flussrichtung ist mit Pfeilen angedeutet. **a.** Mäanderstrukturen und Ausgleichskanal. Der Querschnitt des Ausgleichkanals ist im Vergleich zu den Kanälen der Mäander wesentlich grösser, um Druckschwankungen auszugleichen und die folgenden Mäander gleichmäßig zu füllen. **b.** Auslässe der unterschiedlichen Konzentrationsstufen in die Analysekammer. Der Spermienkanal mündet erst nach 5 mm in die Analysekammer.

„Panda rei!“

Funktioniert der Gradientenmischer? Wir können mit Heraklit antworten: „Panda rei! - Alles fließt!“. Die Abbildung 4 a zeigt einen funktionsfähigen Gradientenmischer mit 32 Konzentrationsstufen. Die Breite der einzelnen Konzentrationsstufen ist kleiner als der Durchmesser der kreisförmigen Spermienbahn. Das ist wichtig, weil die Spermien den Konzentrationsgradienten ansonsten nicht „spüren“ würden. Der Gradientenmischer hat drei Einlässe. Warum drei? Während man mit zwei Einlässen nur lineare Gradienten erzeugt, sind mit drei Einlässen auch kompliziertere Gradienten möglich. Welche Formen von Gradienten dies genau sind, haben wir in einer Simulation vorab untersucht (Abbildung 4 b). Für die Untersuchung der Chemotaxis der Spermien sind die positive Parabel-Form (rot) und die verschobene lineare Form (magenta) besonders

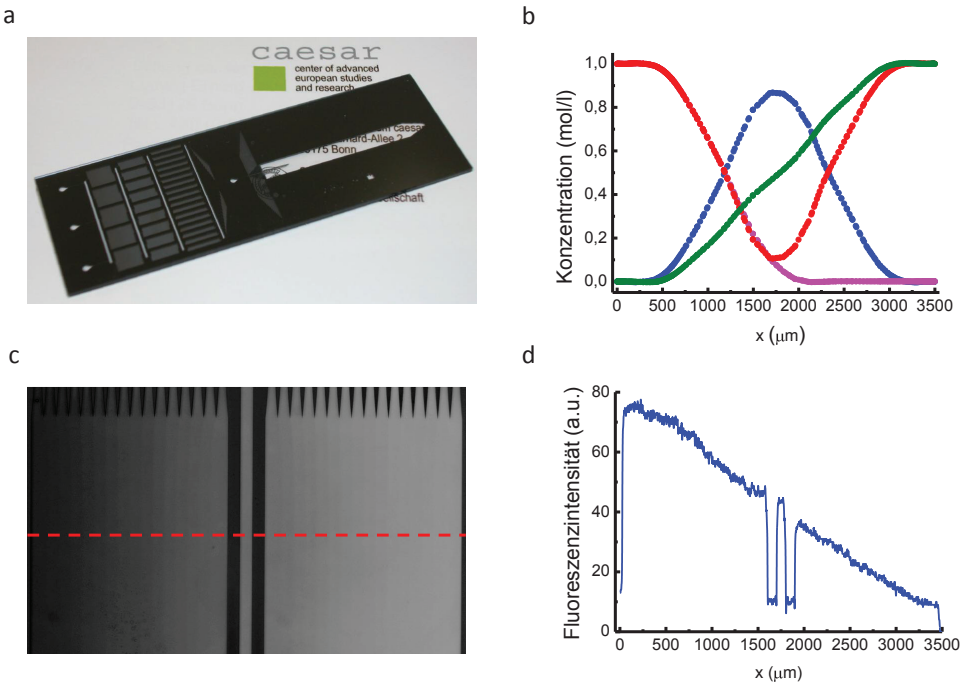


Abbildung 4: Auf der Suche nach dem besten Gradienten. a. Transparenter Gradientenmischer mit drei Einlässen. **b.** Simulierte Konzentrationsgradienten, die bei drei Konzentrationseinlässen möglich sind. **c.** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines linearen Fluorescein-Gradienten mit 32 Konzentrationsstufen. In der Mitte sieht man den Spermieneinlass, der 5 mm in die Analysekammer hinein geführt ist. **d.** Normierte Intensitätsverteilung eines linearen Gradienten entlang der gestrichelten Linie aus Abbildung 4 c. Die Konzentration im Spermienkanal ist an die mittlere Konzentration des linearen Gradienten angepasst.

geeignet. In beiden Fällen ist die Konzentration in der Mitte der Analysekammer gering. Werden die Spermien dort platziert, dann können sie in Richtung aufsteigender Konzentration wandern. Die Simulation haben wir auch experimentell bestätigt. Abbildung 4 c zeigt beispielhaft eine lichtmikroskopische Aufnahme eines linearen Konzentrationsgradienten aus Fluorescein. Die Konzentration des Fluorescein nimmt von rechts nach links im Bild ab und somit auch die Helligkeit. In Abbildung 4 d ist dieser lineare Gradient als Intensitätsprofil gezeigt. Dabei wurde die Fluoreszenzintensität entlang der roten Linie aus Abbildung 4 c ausgewertet.

Alles fließt. Aber wollten wir nicht eigentlich einen Gradienten ohne Fluss haben, in dem sich die Spermien frei bewegen können? Wie schaffen wir das? Momentan stoppen wir den Fluss abrupt, nachdem wir die Spermien platziert haben. So kann die Analyse der Spermienbewegung für mehrere Minuten in einem relativ stabilen Gradienten untersucht werden. Unser Ziel ist jedoch, einen Konzentrationsgradienten zu erzeugen, der für mehrere Stunden stabil bleibt. Um das zu schaffen, planen wir einen Mischer mit zwei Ebenen zu erzeugen. In der ersten Ebene wird ein Konzentrationsgradient mit Fluss erzeugt. Der Gradient wird binnen weniger Millisekunden durch eine Porenmatrix in die zweite Ebene übertragen, in der sich die Analysekammer befindet [2]. Der Fluss hingegen wird durch diePorenmatrix aufgehalten [3]. In der Analysekammer können dann Spermien in einem Konzentrationsgradienten ohne Fluss analysiert werden.

Literatur

[1] Alvarez, L., Dai, L., Friedrich, B.M., Kashikar, N., Gregor, I., Pascal, R. & Kaupp, U.B. (2012) "The rate of change in Ca^{2+} concentration controls sperm chemotaxis" *J. Cell Biol.* 196, 653-663

[2] Lazzara, D. T., Mey, I., Steinem, C. & Janshoff, A. (2011) "Benefits and Limitations of Porous Substrates as Biosensors for Protein Adsorption" *Anal. Chem.* 83, 5624–5630

[3] Palacci, J., Abecassis, B., Cottin-Bizonne, C., Ybert, C. & Bocquet, L. (2010) "Colloidal Motility and Pattern Formation under Rectified Diffusiophoresis" *Phys. Rev. Lett.* 104, 138302/1-138302/4

Nanophotonik

Stephan Irsen, Felix von Cube und Stefan Linden

Kontakt
Dr. Stephan Irsen
Forschungszentrum caesar
Projektgruppe Elektronenmikroskopie und Analytik
Telefon: (0228) 9656-264
stephan.irsen@caesar.de

Prof. Dr. Stefan Linden
Universität Bonn
Physikalisches Institut
Gruppe Nanophotonik
Telefon: (0228) 73-2183
linden@physik.uni-bonn.de

Durch gezielte Strukturierung von Metallen im Nanometer-Bereich kann man Werkstoffe mit interessanten optischen Eigenschaften erzeugen. Diese sogenannten Metamaterialien können beispielsweise einen negativen Brechungsindex besitzen oder eine ausgeprägte optische Aktivität aufweisen. Mögliche Anwendungen sind eine perfekte Linse, breitbandige Polarisationsoptiken oder eine Tarnkappe. Wir befassen uns mit den grundlegenden physikalischen Eigenschaften solcher Metamaterialien. Als Basisbaustein für die Untersuchung verwenden wir *Split-Ring*-Resonatoren; deren optische Eigenschaften lassen sich mit einem Transmissions-Elektronenmikroskop genau analysieren.

Metamaterialien bestehen aus metallischen Basisbausteinen, den „Metaatomen". Diese Bausteine sind gleichmäßig angeordnet, meist zu einem Gitter [1,2]. Bestrahlt man ein solches Gitter mit einer elektromagnetischen Welle, kommt es zu Wechselwirkungen mit den Leitungsbandelektronen der Metaatome. Die Leitungsbandelektronen beginnen zu schwingen. Diese Schwingungen nennt man Plasmonen. Ist die Wellenlänge der einstrahlenden elektromagnetischen Welle deutlich größer als der Abstand zwischen benachbarten Metaatomen, können die einzelnen Metaatome nicht mehr aufgelöst werden. Man erhält ein optisch homogenes Medium. Ein bekanntes Beispiel für ein solches Material ist die gelochte Folie in den Türen von Mikrowellenöfen. Die wenige Millimeter großen Löcher sind transparent für sichtbares Licht (Wellenlänge von Nanometern); Mikrowellen (Wellenlänge von Zentimetern) können die Struktur jedoch nicht passieren und werden vollständig reflektiert. Wir können so zuschauen, wie unser Essen gar wird, ohne der Mikrowellenstrahlung ausgesetzt zu sein.

Um die Grundlagen von Metamaterialen zu untersuchen, wird häufig der sogenannte *Split-Ring*-Resonator (SRR) eingesetzt. Der SRR ist ein metallischer Nanodraht mit Hufeisenform. Physikalisch kann der SRR in erster Näherung als elektrischer Schwingkreis angesehen werden. Ein solcher Schwingkreis besteht normalerweise aus einer Spule und einem Kondensator. Bei der Wechselwirkung mit einer

elektromagnetischen Welle wird in der Spule ein Strom induziert, der den Kondensator auflädt. Dadurch wird der Schwingkreis angeregt. Beim SRR wirkt die Öffnung des Hufeisens als Kondensator; das Hufeisen selbst kann als einzelne Windung einer Spule angesehen werden. Dieser Schwingkreis wird durch einfallendes Licht oder Elektronen angeregt. Die bei dieser Anregung entstehenden Schwingungen, die Plasmonen, lassen sich mit einem Transmissions-Elektronenmikroskop (TEM) analysieren. Dazu muss das TEM mit einem Spektrometer ausgestattet sein. Dann kann man genau messen, welche Energie beim Durchgang eines Elektrons durch das Metamaterial aufgrund der Anregung eines Plasmons absorbiert wurde. Dieses Verfahren heißt Elektronen-Energieverlust-Spektroskopie (EELS). Für uns sind die Anregungsenergien der Plasmonen von besonderem Interesse. Da sich diese oftmals nur geringfügig unterscheiden, ist ein TEM mit extrem guter Energieauflösung nötig. Ein solches TEM steht uns bei caesar mit dem ZEISS Libra200 Cs-STEM MC (CRISP) zur Verfügung. Das CRISP ermöglicht Energieauflösungen kleiner als 0.14 eV.

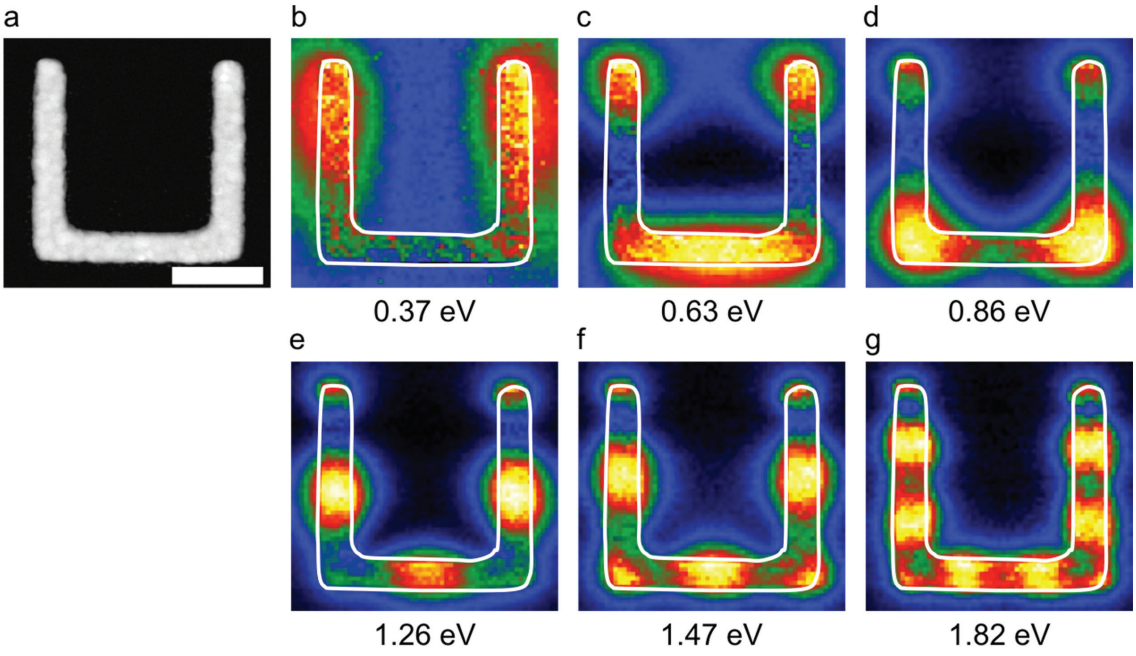


Abbildung 1: Plasmonmoden eines *Split-Ring*-Resonators (SRR). a. STEM Dunkelfeldbild eines SRR aus Gold. Dicke: 35 nm, Kantenlänge: 500 nm. **b.-g.** EELS-Karten des SRR. Dargestellt sind die Plasmonmoden mit ansteigender Energie. Helle Bereiche stehen für eine große Energieverlust-Wahrscheinlichkeit der Elektronen, dunkle Bereiche für eine niedrige. Die weißen Linien skizzieren die Umrisse des SRR. Der Skalenbalken entspricht 200 nm [4].

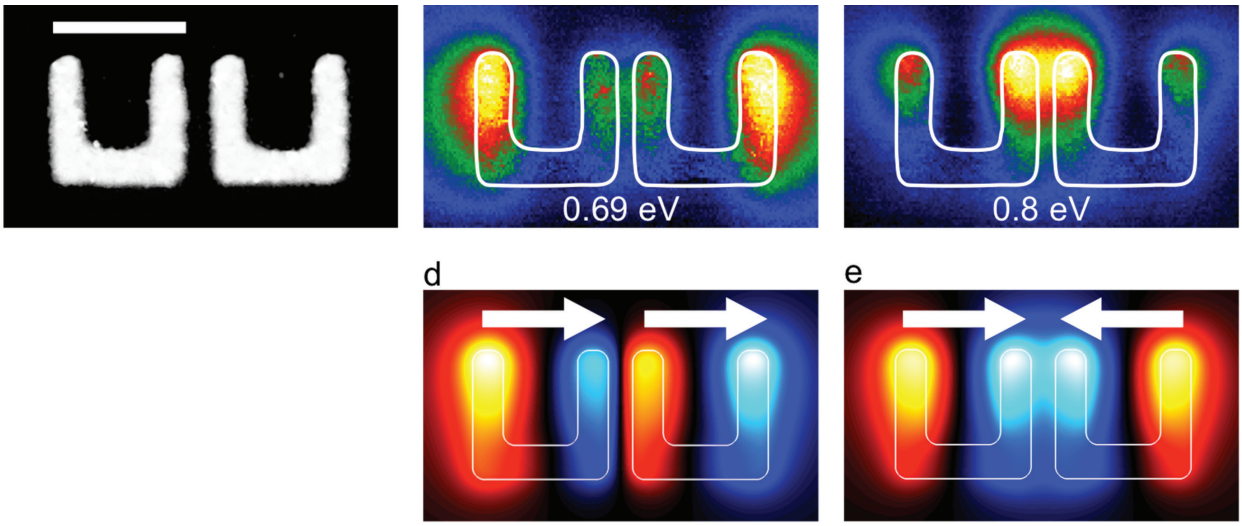


Abbildung 2: Plasmonmoden eines SRR-Dimers. a. STEM Dunkelfeldbild. **b.** EELS-Karte der optisch hellen Mode, mit Maxima an den beiden äußeren Armen. **c.** EELS-Karte der optisch dunklen Mode, mit einem Maximum an den inneren Armen. **d.** und **e.** sind Simulationen des SRR-Dimers. Rot steht für eine hohe Dichte negativer Ladungsträger, blau für eine hohe Dichte positiver Ladungsträger. Die daraus entstehenden Dipolmomente sind mit weißen Pfeilen skizziert. Die Simulationen [5] wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Kurt Busch [HU Berlin] mit der *Discontinuos Galerkin Time Domain*-Methode erstellt. Die weißen Pfeile geben die Schwingungsrichtungen der Plasmonen an.

Rastert man während der EELS-Analyse das Metamaterial mit dem Elektronenstrahl ab (dieses Verfahren nennt man STEM), kann man die Plasmonen eines SRR bildlich darstellen [3]. Abbildung 1 zeigt die Ergebnisse einer solchen Untersuchung. Die EELS-Karten in den Abbildungen 1b-g zeigen sechs verschiedene Schwingungszustände (Plasmonmoden) des analysierten SRR.

Plasmonmoden eines SRR lassen sich anschaulich – analog zu den Schwingungen einer Gitarrensaite – als Schwingung von Ladungsträgern entlang eines Drahtes interpretieren. Für die Grundmode erwartet man EELS-Signale an den Enden des Drahtes (Abbildung 1b). Für die nächsthöher angeregte Mode („erste Oberschwingung“) erwarten wir ein weiteres Maximum in der Mitte des Drahtes (Abbildung 1c). Für jede zusätzliche Mode erwarten wir stets ein weiteres Maximum.

Für die meisten Anwendungen ist ein einzelner *Split-Ring*-Resonator nicht ausreichend. Man benötigt eine größere Fläche von SRR, um eine effektive Wechselwirkung mit elektromagnetischen Wellen zu erzielen.

Für das grundsätzliche Verständnis lohnt es sich aber, zunächst die Wechselwirkung zweier benachbarter *Split-Ring*-Resonatoren (SRR-Dimer) zu untersuchen. Da sich in beiden *Split-Ring*-Resonatoren Ladungen bewegen, also ein Strom fließt, können wir davon ausgehen, dass die beiden SRR miteinander elektromagnetisch wechselwirken, sobald ihr Abstand klein genug ist. Diese Wechselwirkung zeigt sich in einer Änderung der EELS-Signale. Abbildung 2 zeigt ein Beispiel für ein SRR-Dimer.

Man könnte erwarten, dass das Dimer die gleichen Plasmonmoden wie zwei isolierte *Split-Ring*-Resonatoren aufweist. Das ist jedoch nicht der Fall. Vielmehr spaltet die Grundmode in zwei verschiedene Zustände auf: Im ersten Zustand schwingen die im SRR angeregten Elektronen in die gleiche Richtung – sie sind in Phase.

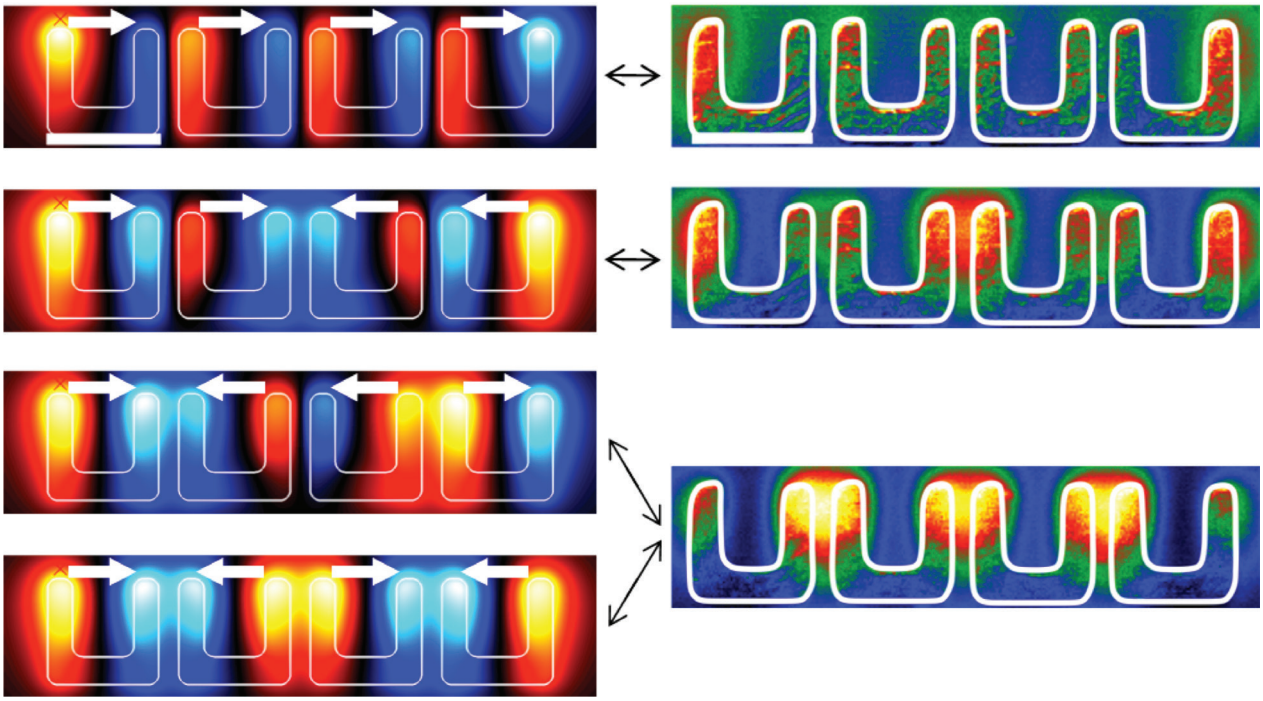


Abbildung 3: EELS-Karten von vier benachbarten SRR. Auf der linken Seite befinden sich Nahfeld-Simulationen der vier zu erwartenden Plasmonmoden. Die dazugehörigen Schwingungszustände sind eingezeichnet (weiße Pfeile). Auf der rechten Seite sind die gemessenen EELS-Karten abgebildet. Da die dritte und vierte Mode energetisch so nah beieinander liegen, können sie in bisherigen Experimenten nicht aufgelöst werden. Die experimentellen Daten entsprechen den Energien: 0,69 eV; 0,73 eV und 0,77 eV (von oben nach unten). Die Skalenbalken entsprechen 200 nm [6].

In den direkt benachbarten Armen der beiden SRR sehen wir nur ein schwaches Signal. Im zweiten Zustand der Mode sind die Schwingungsrichtungen antiparallel. Jetzt treffen bei den benachbarten SRR-Armen gleiche Vorzeichen aufeinander; wir sehen im Experiment ein deutliches Maximum (Abbildung 2c). Es sei nochmals angemerkt, dass es sich bei den beiden Moden nicht um Moden unterschiedlicher Ordnungen handelt; es handelt sich hier nur um das Aufspalten der Grundmode.

Erhöhen wir die Anzahl der miteinander wechselwirkenden SRR, spaltet sich die Grundmode in weitere Zustände auf. Im Falle von vier SRR erwarten wir eine Aufspaltung in vier unterschiedliche Zustände. Der energetisch günstigste entspricht dem Fall, dass die Plasmonen aller vier SRR in die gleiche Richtung schwingen (→→→→, Abbildung 3, erste Zeile). Im zweiten Zustand sind die Schwingungsrichtungen des ersten und zweiten SRR sowie des dritten und vierten SRR untereinander parallel angeordnet. Die SRR-Dimere (1/2 und 3/4) stehen antiparallel zueinander (→→←←). Die beiden weiteren physikalisch möglichen Zustände (→←←→ und →←→←) können wir an unserem TEM nicht mehr auflösen; hier messen wir nur einen Zustand.

Vom SRR zum Metamaterial

Ein Lichtstrahl (Laser), der auf einen einzelnen SRR trifft, ändert seine Eigenschaften nur geringfügig. Die meisten Anwendungen von Metamaterialien benötigen Flächen oder Volumina mit tausenden von Nanostrukturen. Wir untersuchen daher auch Gitter mit periodisch angeordneten SRR. In Abbildung 4 ist ein zweidimensionales Gitter mit 100 x 100 SRR gezeigt. Die beiden gezeigten EELS-Karten stammen aus dem Zentrum und der linken oberen Ecke des Gitters. Wir erwarten bei diesem Gitter 100 x 100 = 10.000 verschiedene Zustände der Grundmode. Numerische Simulationen sind mit dieser Anzahl an Wechselwirkungspartnern überfordert; eine einzige Berechnung würde Jahre dauern. Unsere Daten zeigen, dass die verschiedenen Moden im Inneren des Gitters zu einer breiten Mode hybridisieren: Die einzelnen Moden liegen energetisch so dicht beieinander, dass sie sich nicht mehr auflösen lassen. Sie können als Kontinuum angesehen werden.

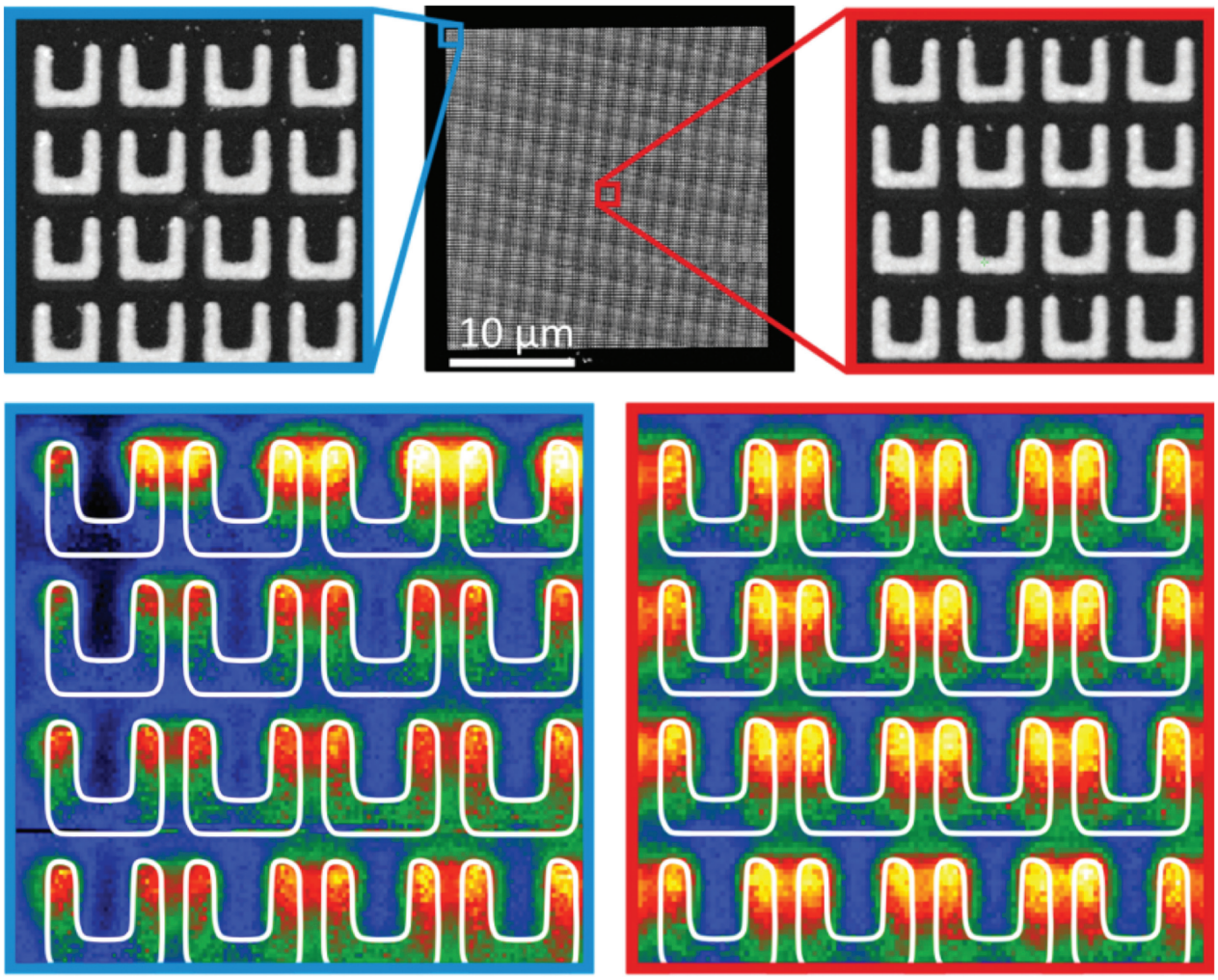


Abbildung 4: EELS-Karten eines 2D Metamaterials. Im oberen Teil des Bildes ist mittig eine Übersicht des 100 x 100 SRR-Gitters gezeigt, links davon eine Nahaufnahme der linken oberen Ecke und rechts davon eine Nahaufnahme des Zentrums. Im unteren Teil des Bildes sind die dazugehörigen EELS-Karten abgebildet.

Am Rand des Gitters (linke Hälfte von Abbildung 4) erkennt man jedoch ein etwas anderes Verhalten. Man sieht hier starke Anregungswahrscheinlichkeiten an den Enden der oberen SRR, aber so gut wie keine an den linken äußeren SRR des Gitters. Diese Randeffekte kommen dadurch zustande, dass die SRR am Rand deutlich weniger Wechselwirkungspartner in ihrer näheren Umgebung haben.

Zusammenfassend lässt sich festhalten: Aus dem Verhalten eines einzelnen *Split-Ring*-Resonators lässt sich nicht auf das Verhalten eines Metamaterials schließen, das aus vielen tausend *Split-Ring*-Resonatoren besteht. In der Umgebung anderer SRR verändern sich sowohl Modenprofil als auch Resonanzfrequenz der SRR. Jeder umgebende SRR führt zu einer weiteren Mode. Im Fall mehrerer tausend SRR hybridisieren die einzelnen Grundmoden zu einer einzelnen, spektral verbreiterten Mode. Doch nur im Inneren des Metamaterials liegen homogene optische Eigenschaften vor.

Literatur

[1] Zheludev, N.I. (2010) "The road ahead for metamaterials" *Science*, 328, 582-583

[2] Soukoulis, C.M. & Wegener, M. (2011) "Past achievements and future challenges in the development of three-dimensional photonic metamaterials" *Nature Photon.* 5, 523-530

[3] Nelayah, J., Kociak, M., Stéphan, O., García de Abajo, F.J., Tencé, M., Henrard, L., Taverna, D., Pastoriza-Santos, I., Liz-Marzán, L.M. & Colliex, C. (2007) "Mapping Surface Plasmons on a single Metallic Nanoparticle" *Nature Physics* 3, 348-353

[4] von Cube, F., Irsen, S., Niegemann, J., Matyssek, C., Hergert, W., Busch, K. & Linden, S. (2011) "Spatio-spectral characterization of photonic meta-atoms with electron energy-loss spectroscopy" *Opt. Mater. Express* 1, 1009-1018

[5] Busch, K., König, M. & Niegemann, J. (2011) "Discontinous Galerkin methods in nanophotonics" *Laser & Photon. Rev.* 5, 773-809

[6] von Cube, F., Irsen, S., Diehl, R., Niegemann, J., Busch, K. & Linden, S. (2013) "From Isolated Metaatoms to Photonic Metamaterials: Evolution of the Plasmonic Near-Field" *Nano Letters* 13, 703-708

Berichte über abgeschlossene Doktorarbeiten

CNGK: Ein außergewöhnlicher Ionenkanal für externe Befruchtung?

Sylvia Fechner

Kontakt
Dr. Sylvia Fechner
Forschungszentrum caesar
Abteilung Molekulare Neurosensorik
Telefon: (0228) 9656-224
sylvia.fechner@caesar.de

Ionenkanäle sind Proteine, die Poren in der Zellmembran bilden. Sie dienen als Schleusen, die durch chemische oder physikalische Signale geöffnet oder geschlossen werden können. Öffnet ein Ionenkanal, fließen Ionen in die Zelle hinein oder heraus und erzeugen einen Spannungspuls. Einige Ionenkanäle werden durch Ligandenbindung geöffnet; wir sprechen von liganden-aktivierten Ionenkanälen. Ich habe mich in meiner Arbeit mit einem neuen Mitglied der liganden-aktivierten Kanäle beschäftigt: den Kalium-selektiven zyklisch Nukleotid-gesteuerten Kanälen (CNGK). In Seeigelspermien spielen diese Kanäle eine Schlüsselrolle im chemotaktischen Signalweg. In meiner Doktorarbeit untersuchte ich die Rolle dieses Kanaltyps in Zebrafischspermien.

Zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) und zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) – kleine zelluläre Botenstoffe – öffnen CNG-Kanäle. Klassische CNG-Kanäle leiten hauptsächlich Natrium und Kalzium. Kürzlich wurde ein ungewöhnlicher Ionenkanaltyp entdeckt, der zwar klassischen CNG-Kanälen ähnelt, sich aber auch auf charakteristische Weise von ihnen unterscheidet: Er ist Kalium-selektiv (CNGK) – daher auch das „K“ im Namen –, er reagiert 1000fach empfindlicher auf cGMP und er ist anders aufgebaut. Während klassische CNG-Kanäle aus vier Untereinheiten bestehen, die sich zu einem Tetramer zusammenlagern, sind die vier „Untereinheiten“ beim CNGK-Kanal auf einem langen Polypeptid angeordnet, das sich zu einem Pseudotetramer faltet (Abbildung 1). In den caesar-Jahresberichten 2008 („Ein außergewöhnlicher Ionenkanal kontrolliert das Schwimmverhalten von Seeigelspermien“) und 2009 („Kontaktanzeige eines Spermiums: Sensibelchen sucht Eizelle zum Verschmelzen“) haben wir über diesen CNGK-Kanal ausführlich berichtet. Der Kanal ist der Schlüssel zur Einzelmolekül-Empfindlichkeit der Seeigelspermien [1, 2].

Dieser besondere Kanal kommt nicht nur in Einzellern und Wirbellosen vor, sondern auch in Wirbeltieren. CNGK-Kanäle kommen vornehmlich in Lebewesen mit externer Fortpflanzung vor: Die Befruchtung findet außerhalb des Körpers statt; Eizelle und Spermien werden oft ins

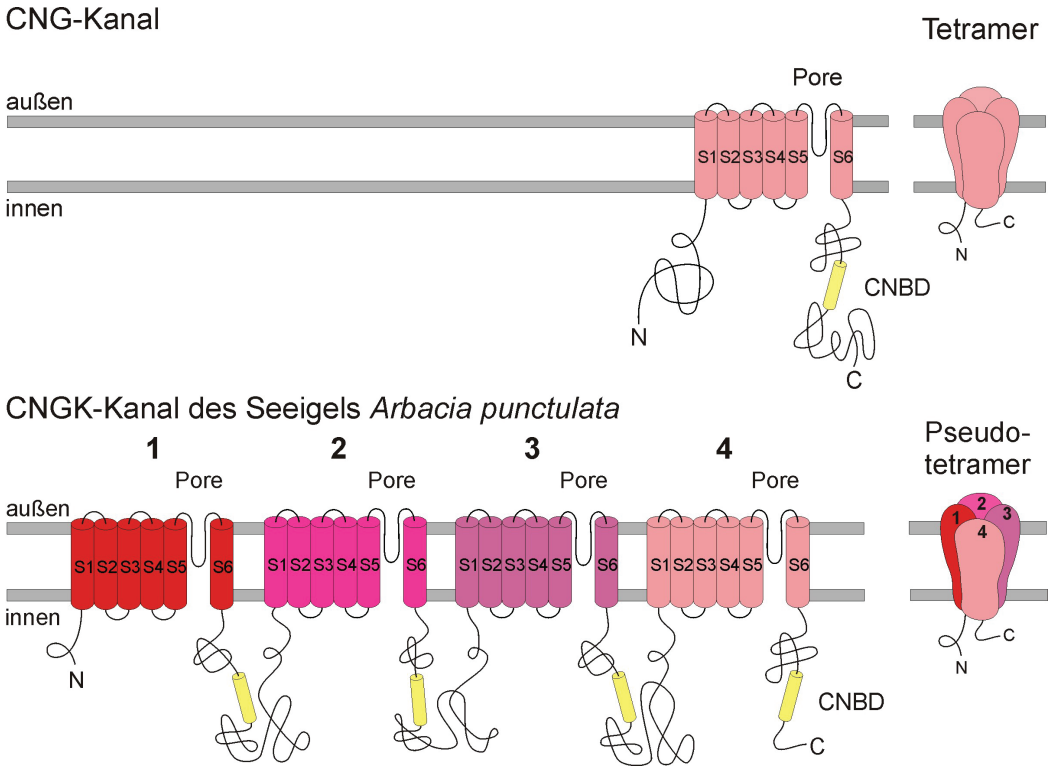


Abbildung 1: Vergleich der Strukturen von klassischen CNG-Kanälen und des CNGK-Kanals von *Arbacia punctulata*. Die Abbildung zeigt den Aufbau der Polypeptidkette der CNGK-Kanäle im Vergleich zu CNG-Kanälen und die Zusammenlagerung als Tetramer bzw. Pseudotetramer. Mit S1 - S6 sind die transmembranalen Segmente gekennzeichnet. Die „Untereinheiten" sind mit 1 - 4 nummeriert. N- und C-Terminus sind mit N bzw. C markiert. Gelbe Zylinder stellen die Bindestelle für zyklische Nukleotide dar (CNBD).

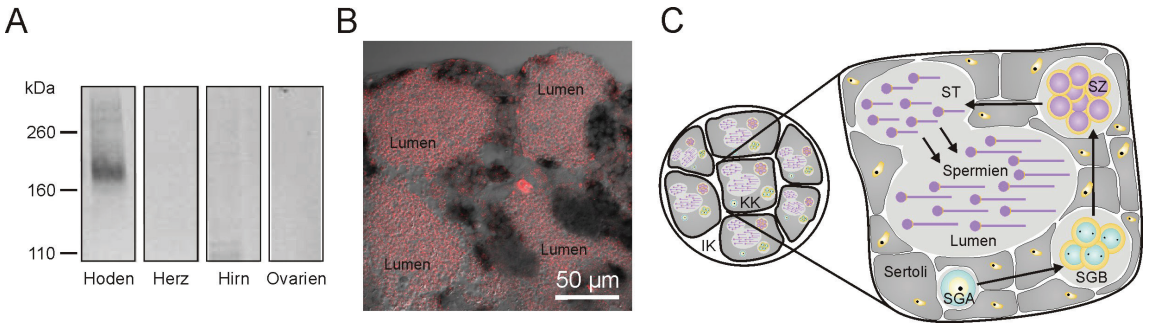


Abbildung 2: Lokalisation des CNGK-Kanals im Zebrafisch *Danio rerio* (DrCNGK). A. *Western Blot*-Analyse verschiedener Zebrafischgewebe. **B.** Überlagerung des RNA-Nachweises (*In situ*-Hybridisierung mit DrCNGK-spezifischer RNA-Sonde, braune Färbung) und der Antikörper-Färbung mit dem anti-DrCNGK-Antikörper (rötliche Färbung). **C.** Vereinfachte schematische Darstellung eines Hodenquerschnitts des Zebrafisches. KK: Keimzell-Kompartiment, IK: Intertubuläres Kompartiment, SGA = primäre Spermatogonien, SGB = Sekundäre Spermatogonien, SZ = Spermatozyten, ST = Spermatiden. Modifiziert nach [3].

Wasser abgegeben. In Vertebraten wurde der CNGK-Kanal bislang nur in Süßwasserfischen identifiziert. In Säugetieren, bei denen die Befruchtung innerhalb des Körpers stattfindet, kommt der Kanal nicht vor. Es stellt sich daher die Frage, ob die CNGK-Kanäle für die externe Befruchtung wichtig sind. In meiner Doktorarbeit wollte ich herausfinden, welche physiologische Rolle der CNGK-Kanal des Zebrafisches *Danio rerio* (DrCNGK) spielt.

Der CNGK-Kanal kommt in Zebrafischspermien vor

Mit Hilfe der *Western Blot*-Analyse und der Massenspektrometrie konnte ich das Protein in Hodengewebe nachweisen (Abbildung 2 A). Um zu bestimmen, in welchen Zellen der Kanal vorkommt, wurden verschiedene Färbetechniken an Querschnitten des Hodengewebes angewendet (Abbildung 2 B). Im Keimzell-Kompartiment findet die Reifung der Spermien statt; die Vorläuferzellen befinden sich am Rand, während sich die reifen Spermien im Lumen befinden (Abbildung 2 C).

Die für das CNGK-Protein kodierende Ribonukleinsäure (RNA) befindet sich ausschließlich in den Vorläuferzellen (Abbildung 2 B, braune Färbung). Dagegen ist das CNGK-Protein stärker im Lumen des Hodens lokalisiert, dort, wo sich die reifen Spermien befinden (Abbildung 2 B, rötliche Antikörper-Färbung). Der CNGK-Kanal lässt sich also in Zebrafischspermien nachweisen.

***Patch-Clamp*-Technik an Zebrafischspermien**

Der Strom durch Ionenkanäle kann mit der *Patch-Clamp*-Technik gemessen werden. Mithilfe einer winzigen Glaspipette wird das Signal registriert. Aus dem Stromsignal lässt sich schließen, durch welche Kanäle der Strom fließt, wie sie gesteuert werden, für welche Ionen sie selektiv sind und welche physiologische Rolle sie spielen.

Die *Patch-Clamp*-Technik ist anspruchsvoll und erst vor wenigen Jahren gelang es elektrophysiologisch von Spermien abzuleiten [4, 5]. An Fischspermien jedoch gibt es solche Untersuchungen bislang nicht. Es ist mir gelungen, die *Patch-Clamp*-Technik erstmalig an Zebrafischspermien erfolgreich einzusetzen.

Abbildung 3 zeigt das Ergebnis eines solchen Experiments. Trägt man den gemessenen Strom gegen die angelegte Spannung

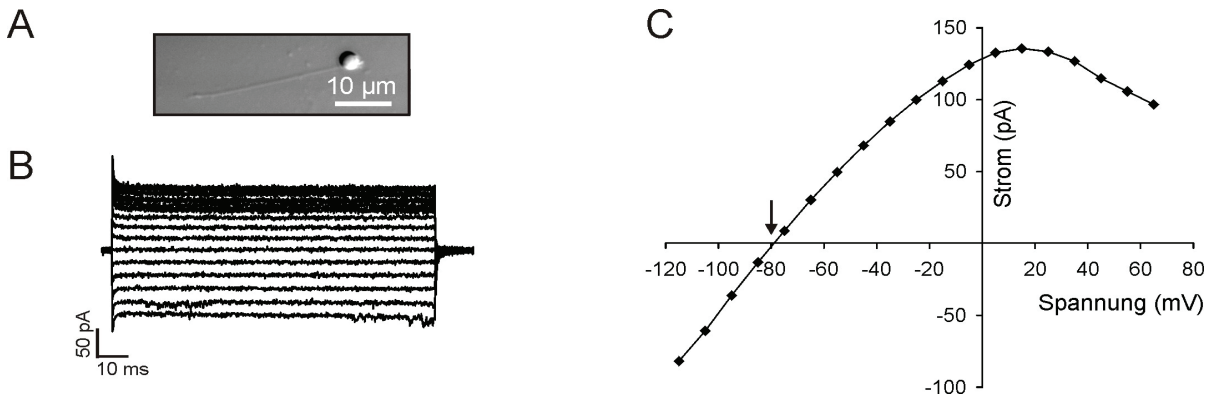


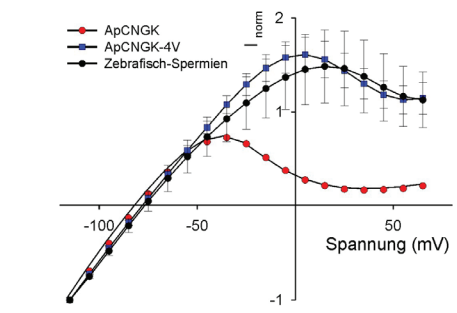
Abbildung 3: *Patch-Clamp*-Untersuchungen an Zebrafischspermien. A. Zebrafischspermium. **B.** Elektrophysiologische Ableitung eines Zebrafischspermiums. **C.** Strom-Spannungskurve der Messung in B. Das Umkehrpotenzial ist mit einem schwarzen Pfeil markiert.

auf, schneidet die Kurve die Spannungsachse beim sogenannten Umkehrpotenzial (-79,4 mV; Abbildung 3 C); hier fließt kein Strom mehr. Ein Umkehrpotenzial von ca. -80 mV zeigt, dass dieser Strom von Kalium-Ionen getragen wird.

Wird dieser Kalium-Strom durch den CNGK-Kanal geleitet? Diese Frage ist gar nicht so einfach zu beantworten; es gibt schließlich viele verschiedene Kalium-Kanäle. Ich habe deshalb geprüft, ob der Kalium-Kanal in Zebrafischspermien durch zyklische Nukleotide geöffnet wird – so wie der CNGK-Kanal in Seeigelspermien. Meine Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Kalium-Strom in Zebrafisch-spermien nicht durch zyklische Nukleotide reguliert wird. Entweder handelt es sich nicht um einen CNGK-Kanal, sondern um einen anderen Kalium-Kanal; oder der CNGK-Kanal in Zebrafischspermien wird nicht durch zyklische Nukleotide reguliert. Beispielsweise gibt es Ionenkanäle, wie die Familie der KCNH-Kanäle, die zwar eine Bindestelle für zyklische Nukleotide besitzen, aber nicht von diesen Botenstoffen reguliert werden.

Um zu zeigen, dass es sich bei dem Kalium-Strom aus Zebrafisch-spermien um den CNGK-Kanal handelt, sollte der Kanal in Wirtszellen charakterisiert werden. Das Problem dabei war: Die Zellen haben zwar das Protein hergestellt, es erreichte aber nicht die Plasmamembran. Daher gelang es nicht *Patch-Clamp*-Experimente am CNGK-Kanal in diesen Zellen durchzuführen. Ein Alternativplan musste her!

A



B

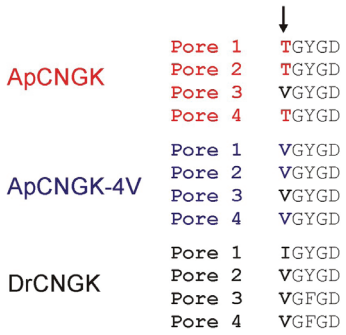


Abbildung 4: Vergleich des Kalium-Stroms durch den Seeigel-CNGK-Kanal mit dem Strom in Zebrafischspermien. A. Strom-Spannungskurven des in Wirtszellen hergestellten CNGK-Kanals von *Arbacia punctulata* (ApCNGK) und einer Porenmutante dieses Kanals (ApCNGK-4V) sowie von Zebrafischspermien. **B.** Vergleich der Aminosäuresequenz der verschiedenen Porenregionen. Die Stelle, an der die Aminosäuren ausgetauscht wurden, ist mit einem schwarzen Pfeil markiert.

Mein Alternativplan

Der Seeigel-CNGK-Kanal lässt sich in Wirtszellen untersuchen [2]. Vergleicht man den Kalium-Strom in Zebrafischspermien mit dem Strom durch den Seeigel-Kanal, stellt man fest, dass die Strom-Spannungskurven sich deutlich voneinander unterscheiden (Abbildung 4 A, rote und schwarze Kurve). Die Strom-Spannungskurve von Zebrafischspermien ist über einen weiten Spannungsbereich fast linear und der Strom nimmt erst bei hohen positiven Spannungen wieder ab. Der Strom durch den Seeigel-Kanal hingegen wird schon bei negativen Spannungen kleiner. Ich konnte zeigen, dass der auswärtsgerichtete Kalium-Strom durch intrazelluläre Natrium-Ionen blockiert wird und so diese „Gleichrichtung" erzeugt. In der Porenregion von Kalium-Kanälen befindet sich ein kurzes Aminosäuremotiv (Glyzin-Tyrosin-Glyzin-Aspartat; GYGD), das die Ionen-Selektivität bestimmt [6]. Gleich neben diesem Motiv befinden sich im CNGK-Kanal des Seeigels drei polare Threonin-Reste (Abbildung 4 B, ApCNGK). Dies ist ungewöhnlich; bis auf wenige Ausnahmen besitzen alle Kalium-Kanäle – auch der Zebrafisch-Kanal – an dieser Stelle die unpolaren Aminosäuren Valin oder Isoleucin (Abbildung 4 B, DrCNGK). Ersetzt man im Seeigel-Kanal diese Threonine durch unpolare Valine, ist der Natrium-Block deutlich geringer ausgeprägt (Abbildung 4 A, blaue Kurve, ApCNGK-4V), d.h. der Strom durch den mutierten Seeigel-Kanal wird dem aus Zebrafisch sehr ähnlich (Abbildung 4 A, blaue und schwarze Kurve). Dies deutet darauf hin, dass der Kalium-Strom in Zebrafischspermien tatsächlich durch den CNGK-Kanal fließt.

Der Zebrafisch lebt, anders als der Seeigel, im Süßwasser. In Salz- und Süßwasser sind die Ionenverhältnisse sehr verschieden; dadurch können sich Gradienten für manche Ionenarten umkehren. Die Natrium-Konzentration beträgt im Salzwasser ~400 mM und im Süßwasser nur ~0,2 mM. Die meisten tierischen Zellen besitzen eine intrazelluläre Natrium-Konzentration von ~10 mM. Deshalb strömt durch einen offenen Natrium-Kanal im Salzwasser Natrium in die Zelle (das Zellinnere wird positiver), während im Süßwasser Natrium aus der Zelle fließen würde (das Zellinnere wird negativer). Wie verhält es sich mit Kalium-Ionen? Die Richtung des Kalium-Gradienten ist in Süß- und Salzwasser gleich – die Kalium-Konzentration ist außen in beiden Fällen niedriger (< 10 mM) als innen. Im Seeigel öffnet der CNGK-Kanal und hyperpolarisiert das Spermium. Dadurch werden hyperpolarisationsaktivierte CNG-Kanäle (Einstrom von Natrium-

Ionen) und CatSper-Kanäle (Einstrom von Kalzium-Ionen; siehe Jahresbericht Melanie Flick, 2011) geöffnet. Diese Kanäle sind Schlüsselelemente des chemotaktischen Signalwegs von Seeigelspermien. Beide Kanaltypen gibt es in Zebrafischspermien nicht. Die Signalwege müssen also ganz unterschiedlich sein. Es ist sogar unklar, ob Zebrafischspermien überhaupt chemotaktisches Verhalten zeigen und ob der CNGK-Kanal dort eine Rolle spielt. Möglicherweise hat sich seine physiologische Funktion im Laufe der Evolution verändert. Wir wollen zukünftig mit genetisch veränderten Fischen die Frage nach der physiologischen Bedeutung des CNGK-Kanals beantworten.

Literatur

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

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

[3] Nobréga, R. H., Batlouni, S. R. & Franca, L. R. (2009) "An overview of functional and stereological evaluation of spermatogenesis and germ cell transplantation in fish" *Physiol. Biochem.* 35, 197-206

[4] Kirichok, Y., Navarro, B. & Clapham, D. E. (2006) "Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca^{2+} channel" *Nature* 439, 737-740

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

[6] Heginbotham, L., Lu, Z., Abramson, T. & MacKinnon, R. (1994) "Mutations in the K^+ channel signature sequence" *Biophys. J.* 66, 1061-1067

Sylvia Fechner hat Biologie an der Universität Bonn studiert. Im April 2008 erhielt sie ihr Diplom für ihre Arbeit am elektrosensorischen Seitenlinienlobus des Elefantenrüsselfischs bei Prof. von der Emde. Für ihre Doktorarbeit wechselte sie in die Abteilung Molekulare Neurosensorik von Prof. Kaupp ans Forschungszentrum caesar. Sie beschäftigte sich mit kaliumselektiven zyklisch Nukleotid-gesteuerten Ionenkanälen verschiedener Spezies. Ihr besonderes Interesse galt dem Zebrafisch. Während ihrer Promotion wurde sie vom Boehringer Ingelheim Fonds gefördert. Im November 2012 hat sie ihren Doktortitel erhalten. Seit Dezember 2012 ist sie wissenschaftliche Mitarbeiter am Forschungszentrum caesar.

Die zwei Gesichter des Lockstoffrezeptors in Seeigelspermien

Magdalena Pichlo

Kontakt
Dr. Magdalena Pichlo
Forschungszentrum caesar
Abteilung Molekulare Neurosensorik
Telefon: (0228) 9656-378
magdalena.pichlo@caesar.de

Eizellen ködern Spermien mit Hilfe von Lockstoffen, die an spezifische Rezeptoren auf der Zelloberfläche binden und ein zelluläres Signal auslösen. Der Lockstoffrezeptor in Seeigelspermien ist eine membranständige Guanylylzyklase (GC), die den zellulären Botenstoff zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) synthetisiert. Ich habe mich in meiner Doktorarbeit mit dieser Klasse von Rezeptoren beschäftigt. Bisher kannte man von diesem Rezeptor-Typ nur ein Gesicht, das der cGMP-Synthese. In meiner Doktorarbeit beschreibe ich ein weiteres Gesicht dieser Rezeptoren.

GCs sind weit verbreitet und dienen vor allem sensorischen Funktionen, um das externe bzw. interne chemische Milieu zu erfassen. Bei Säugetieren steuern sieben verschiedene GCs zahlreiche physiologische Funktionen, beispielsweise das Sehen, Riechen und den Blutdruck. Der kleine Wurm *C. elegans* besitzt 27 unterschiedliche GCs, Pflanzen sogar fast 100. Es ist daher nicht erstaunlich, dass GCs seit langem intensiv erforscht werden. Dennoch weiß man nur wenig darüber, wie Liganden die Enzymaktivität der GCs steuern. Die GC auf der Oberfläche von Seeigelspermien bindet einen Lockstoff, der von der Eizelle ausgesendet wird und den Spermien den Weg weist. Spermien reagieren ungewöhnlich sensitiv auf den Lockstoff: Ein einzelnes Molekül reicht aus, eine biochemische Signalkaskade anzustoßen und das Schwimmverhalten der Spermien zu ändern (Abbildung 1a, [1]).

Werden Spermien mit dem Lockstoff stimuliert, steigt die cGMP-Konzentration schnell an, erreicht bereits nach etwa 200 ms ein Maximum und sinkt dann wieder ab (Abbildung 1b). Anstieg und Abfall werden durch die Synthese bzw. den Abbau von cGMP bestimmt. Nach einiger Zeit wird die GC abgeschaltet – die cGMP-Synthese stoppt. So wird verhindert, dass die Zelle ständig erregt bleibt. In Säugetieren werden GCs innerhalb weniger Minuten inaktiviert [2]. In Seeigelspermien geht das wesentlich schneller [3]: Die GC wird mit einer Zeitkonstante τ von ca. 270 ms inaktiviert. Das bedeutet: Bereits nach wenigen hundert Millisekunden ist der überwiegende Teil der GC abgeschaltet. Durch welche zellulären Mechanismen wird die GC inaktiviert?

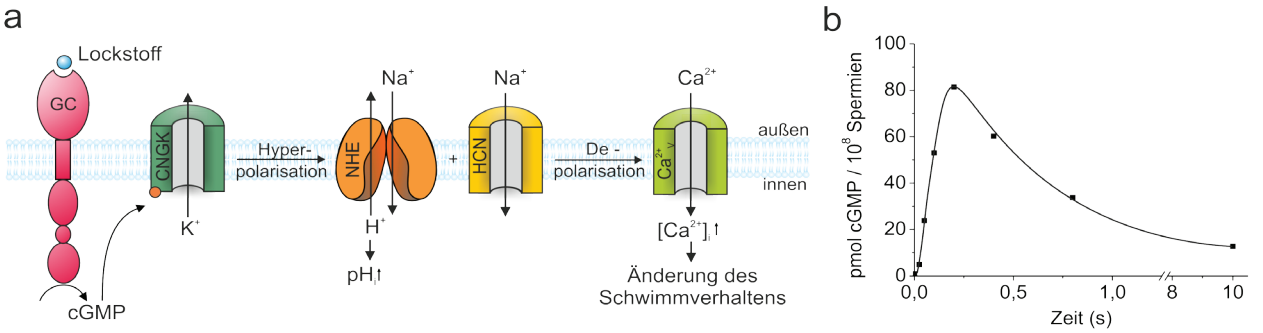


Abbildung 1: Biochemische Signalkaskade in Seeigelspermien. a. Modell der Signalkaskade in Seeigelspermien. Der Lockstoff bindet an die GC, die daraufhin cGMP synthetisiert. cGMP öffnet Kalium-selektive Kanäle (CNGK). Kalium-Ionen strömen aus der Zelle. Die daraus resultierende Hyperpolarisation aktiviert einen Natrium/Protonen-Austauscher (NHE) und öffnet hyperpolarisationsaktivierte und zyklisch-Nukleotid gesteuerte (HCN) Kanäle. Der Natrium-Einstrom durch den HCN-Kanal depolarisiert die Zelle und öffnet Calcium-Kanäle (Ca^{2+}_V). Die einströmenden Calcium-Ionen kontrollieren das Schwimmverhalten der Spermien. **b.** Zeitverlauf der cGMP-Konzentration nach der Stimulation mit dem Lockstoff.

Das Zusammenspiel von Phosphorylierung und Dephosphorylierung ist ein weitverbreiteter zellulärer Mechanismus, über den Enzyme an- und abgeschaltet werden. Bei der Phosphorylierung fügen Kinasen Phosphatreste an bestimmte Aminosäuren (Serin, Threonin und Tyrosin). Bei der Dephosphorylierung werden diese Phosphatreste von sogenannten Phosphatasen wieder abgespalten. Die GCs sind im Ruhezustand phosphoryliert und werden nach Aktivierung dephosphoryliert [2]. Meine Hypothese war, dass die GC in Seeigelspermien durch Dephosphorylierung inaktiviert wird. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die Kinetik der Dephosphorylierung und der Inaktivierung miteinander verglichen. Phosphorylierte und dephosphorylierte GC lassen sich aufgrund ihres unterschiedlichen Laufverhaltens über eine Gelelektrophorese auftrennen. Für dieses Experiment wurden Spermien schnell mit dem Lockstoff gemischt, die Reaktion durch eine starke, oxidierende Säure nach unterschiedlichen Zeiten (25 ms – 3 min) abgestoppt und das Verhältnis von phosphorylierter zu dephosphorylierter GC untersucht. Bereits 100 ms nach der Stimulation kann dephosphorylierte GC nachgewiesen werden. Nach fünf Sekunden sind praktisch alle GC-Moleküle dephosphoryliert (Abbildung 2a). Der Zeitverlauf der Dephosphorylierung ($\tau \approx 280$ ms) und der Inaktivierung der GC

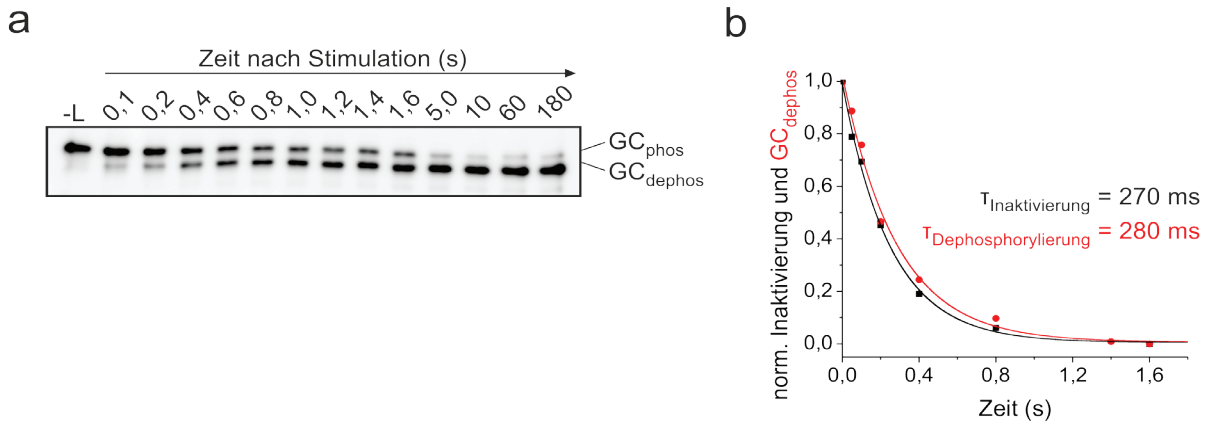


Abbildung 2: Dephosphorylierung der GC. a. Zeitverlauf der Dephosphorylierung nach Stimulation mit dem Lockstoff. Vor der Stimulation ist die GC phosphoryliert (-L). Nach der Stimulation geht die phosphorylierte GC in die dephosphorylierte Form über. **b.** Überlagerung des Zeitverlauf der Dephosphorylierung und der Inaktivierung. Um die beiden Zeitverläufe besser vergleichen zu können, wurden die Kurven auf ihren Maximalwert normalisiert. Beide Reaktionen verlaufen sehr ähnlich.

($\tau \approx 270$ ms) sind verblüffend ähnlich (Abbildung 2b). Dieses Ergebnis stützt, aber beweist noch nicht die Hypothese, dass die GC durch Dephosphorylierung inaktiviert wird; beide Reaktionen könnten auch zufällig gleich schnell ablaufen.

Weitere Experimente sollten diese Hypothese noch gründlicher überprüfen. Dabei bediente ich mich eines Tricks: Die GC kann auch bei stark alkalischen pH-Werten dephosphoryliert werden (Abbildung 3a, [4]). Wenn man die GC zuerst bei stark alkalischen pH-Werten dephosphoryliert und dann mit dem Lockstoff stimuliert, kann sie kein cGMP mehr synthetisieren (Abbildung 3b). Dieses Ergebnis beweist, dass die GC durch Dephosphorylierung abgeschaltet wird.

Eine wichtige Frage aber blieb ungeklärt: Welche Phosphatase dephosphoryliert die GC? Phosphatasen können auf Grund ihrer Struktur und Spezifität unterschieden werden. Um den Phosphatase-Typ zu identifizieren, wurden spezifische Inhibitoren gegen alle bekannten Phosphatasen eingesetzt. Das Ergebnis war überraschend: Egal welcher Inhibitor verwendet wurde, die GC wurde dephosphoryliert. Daraus ergibt sich nur eine mögliche Schlussfolgerung: Die GC dephosphoryliert sich selbst! Damit zeigt uns die GC, neben ihrem bekannten Gesicht – der cGMP-Synthese – ein bisher unbekanntes zweites Gesicht, das der Phosphatase.

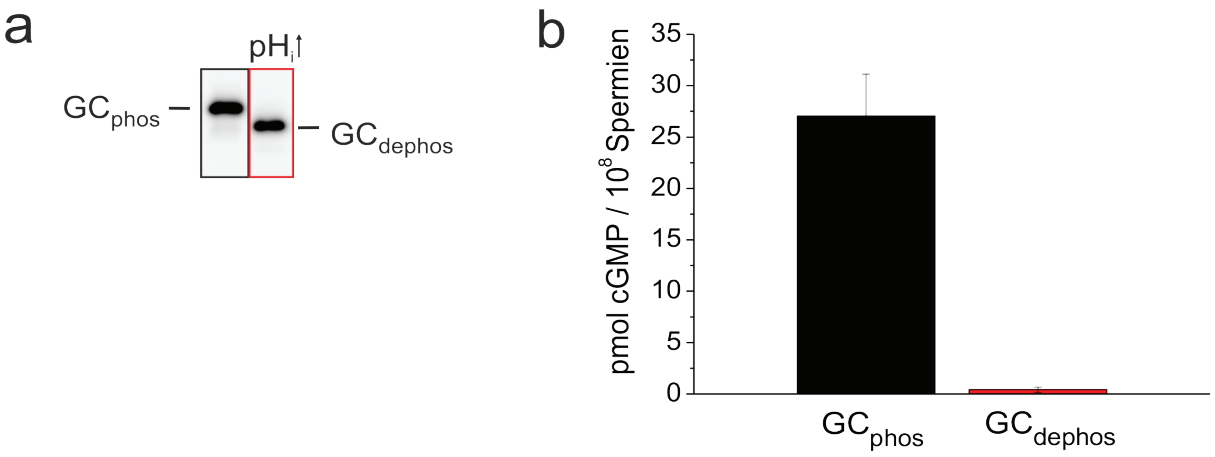


Abbildung 3: Die GC inaktiviert durch Dephosphorylierung. a. Zu Beginn des Versuches sind alle GCs phosphoryliert. Durch einen pH-Anstieg (Alkalisierung) wird die GC vollständig dephosphoryliert. **b.** cGMP-Synthese der phosphorylierten (schwarz) und dephosphorylierten GC (rot) nach Stimulation mit dem Lockstoff. Der Abbau von cGMP wurde durch den Blocker IBMX unterdrückt.

Enzyme, die über verborgene Fähigkeiten verfügen, werden *moonlighter* genannt, in Anlehnung an Menschen, die ihrem Zweitjob nachts im Verborgenen nachgehen. Pflanzen-GCs sind solche *moonlighter*. Ursprünglich waren sie als Kinasen bekannt. Erst kürzlich wurde entdeckt, dass sie Kinase und GC zugleich sind. Möglicherweise trifft das auch auf die GC in Seeigelspermien zu. Alle bisher bekannten membranständigen GCs besitzen eine Kinase-Homologie-Domäne. Diese Domäne weist – wie der Name bereits sagt – Ähnlichkeit mit Kinasen auf. In Pflanzen-GCs fungiert diese Domäne als aktive Kinase. Wenn das auch auf die GC in Seeigelspermien zutrifft, könnte die GC sich nicht nur selbst dephosphorylieren, sondern auch phosphorylieren. Das heißt, die GCs könnten sich selbst an- und wieder abschalten. Diese Hypothese muss allerdings noch experimentell untermauert werden. In meiner Doktorarbeit konnte ich ein bisher unbekanntes Gesicht der GCs enthüllen und den Weg zur Aufklärung eines allgemeinen Regulationsmechanismus dieser Proteinfamilie bahnen.

Magdalena Pichlo (geb. Sznapka) hat an der Universität zu Köln Chemie studiert. Im Septemper 2008 erhielt sie ihr Diplom für die Arbeit an Heterodimeren der Insulinrezeptorkinase bei Prof. Klein. Für ihre Doktorarbeit wechselte sie in die Abteilung von Prof. Kaupp ans Forschungszentrum caesar. Sie beschäftigte sich mit der Regulation des Lockstoffrezeptors in Spermien des Seeigels *Arbacia punctulata*. Im November 2012 erhielt sie dafür ihren Doktortitel und arbeitet seitdem als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Forschungszentrum caesar.

Literatur

[1] Kaupp, U. B. (2012) "100 years of sperm chemotaxis" *J. Gen. Physiol.*140, 583-586

[2] Potter, L. R. (2011) "Guanylyl Cyclase Structure, Function and Regulation" *Cellular Signalling* 23, 1921–1926

[3] Kaupp, U. B., Solzin, J., Hildebrand, E., Brown, J. E., Helbig, A., Hagen, V., Beyermann, M., Pampaloni & F. Weyand, I. (2003) "The Signal Flow and Motor Response Controling Chemotaxis of Sea Urchin Sperm" *Nature Cell Biol.* 5, 109-117

[4] Ward, G. E., Moy, G. W. & Vacquier, V. D. (1986) "Phosphorylation of Membrane-bound Guanylate Cyclase of Sea Urchin Spermatozoa" *J. Biol. Chem.* 103, 95-101

Publikationen

Alvarez, L., Dai, L., Friedrich, B. M., Kashikar, N., Gregor, I., Pascal, R. & Kaupp, U.B. (2012) "The rate of change in Ca^{2+} concentration controls sperm chemotaxis" *J. Cell. Biol.* 196, 653-663

Block, J., Breitsprecher, D., Kühn, S., Winterhoff, M., Kage, F., Geffers, R., Duwe, P., Rohn, J.L., Baum, B., Brakebusch, C., Geyer, M., Stradal, T.E.B., Faix, J. & Rottner, K. (2012) "FMNL2 drives actin-based protrusion and migration downstream of Cdc42" *Curr. Biol.* 22, 1005-1012

Brenker, C., Goodwin, N., Weyand, I., Kashikar, N.D., Naruse, M., Krahling, M., Muller, A., Kaupp, U.B. & Strünker, T. (2012) "The CatSper channel: a polymodal chemosensor in human sperm" *EMBO J.* 31, 1654-1665

Coppola, G., Chinnathambi, S., Lee, J.J., Dombroski, B.A., Baker, M.C., Soto-Ortolaza, A.I., Lee, S.E., Klein, E., Huang, A.Y., Sears, R., Lane, J.R., Karydas, A.M., Kenet, R. O., Biernat, J., Wang, L.S., Cotman, C.W., DeCarli, C.S., Levey, A.I., Ringman, J.M., Mendez, M.F., Chui, H.C., Le Ber, I., Brice, A., Lupton, M.K., Preza, E., Lovestone, S., Powell, J., Graff-Radford, N., Petersen, R.C., Boeve, B.F., Lippa, C.F., Bigio, E.H., Mackenzie, I., Finger, E., Kertesz, A., Caselli, R.J., Gearing, M., Juncos, J.L., Ghetti, B., Spina, S., Bordelon, Y.M., Tourtellotte, W.W., Frosch, M.P., Vonsattel, J.P.G., Zarow, C., Beach, T.G., Albin, R.L., Lieberman, A.P., Lee, V M., Trojanowski, J.Q., Van Deerlin, V.M., Bird, T.D., Galasko, D.R., Masliah, E., White, C.L., Troncoso, J.C., Hannequin, D., Boxer, A.L., Geschwind, M.D., Kumar, S., Mandelkow, E.M., Wszolek, Z.K., Uitti, R.J., Dickson, D.W., Haines, J.L., Mayeux, R., Pericak-Vance, M.A., Farrer, L.A., Ross, O. A., Rademakers, R., Schellenberg, G.D., Miller, B.L., Mandelkow, E., Geschwind, D.H. & Consortiu, A. (2012) "Evidence for a role of the rare p.A152T variant in MAPT in increasing the risk for FTD-spectrum and Alzheimers diseases" *Hum. Mol. Genet.* 21, 3500-3512

Cukkemane, A., Nand, D., Gradmann, S., Weingarth, M., Kaupp, U.B. & Baldus, M. (2012) "Solid-state NMR [(13)C, (15)N] resonance assignments of the nucleotide-binding domain of a bacterial cyclic nucleotide-gated channel" *Biomol. NMR Assign.* 6, 225-229

Czudnochowski, N., Bösken, C.A. & Geyer, M. (2012) "Serine-7 but not serine-5 phosphorylation primes RNA polymerase II CTD for P-TEFb recognition" *Nat. Commun.* 3, 842

Drawnel, F., Wachten, D., Molkentin, J.D., Sjaastad, I., Liu, N., Mikoshiba, K., Bootman, M.D. & Roderick, H.L. (2012) "IP3-induced calcium release engages a pro-hypertrophic autoamplifying loop that relieves miR-133a mediated suppression of IP3RII calcium channels" *Cardiovas. Res.* 93, S8-S8

Drawnel, F.M., Wachten, D., Molkentin, J.D., Maillet, M., Aronsen, J.M., Swift, F., Sjaastad, I., Liu, N., Catalucci, D., Mikoshiba, K., Hisatsune, C., Okkenhaug, H., Andrews, S.R., Bootman, M.D. & Roderick, H.L. (2012) "Mutual antagonism between IP3RII and miRNA-133a regulates calcium signals and cardiac hypertrophy" *J. Cell. Biol.* 199, 783-798

Fatouros, C., Pir, G.J., Biernat, J., Koushika, S.P., Mandelkow, E., Mandelkow, E.M., Schmidt, E. & Baumeister, R. (2012) "Inhibition of tau aggregation in a novel Caenorhabditis elegans model of tauopathy mitigates proteotoxicity" *Hum. Mol. Genet.* 21, 3587-3603

Fechner, S. (2012) "Charakterisierung K^+- selektiver zyklisch Nukleotid-gesteuerter Ionenkanäle aus Danio rerio und Branchiostoma floridae", Dissertation: Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Flick, M. (2012) "CatSper-Ionenkanäle in Spermien des Seeigels Arbacia punctulatas", Dissertation: Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Götz, N., Sauter, D., Usmani, S.M., Fritz, J.V., Goffinet, C., Heigele, A., Geyer, M., Bibollet-Ruche, F., Learn, G.H., Fackler, O.T., Hahn, B.H. & Kirchhoff, F. (2012) "Reacquisition of Nef-mediated tetherin antagonism in a single in vivo passage of HIV-1 through its original chimpanzee host" *Cell Host & Microbe* 12, 373-380

Heneka, M.T., Kummer, M.P., Stutz, A., Delekate, A., Schwartz, S., Vieira-Saecker, A., Griep, A., Axt, D., Remus, A., Tzeng, T.C., Gelpi, E., Halle, A., Korte, M., Latz, E. & Golenbock, D.T. (2012) "NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice" *Nature* 493, 674-678

Hillmann, A., Hahn, S., Schilling, S., Hoffmann, T., Demuth, H.U., Bulic, B., Schneider-Axmann, T., Bayer, T. A., Weggen, S. & Wirths, O. (2012) "No improvement after chronic ibuprofen treatment in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease" *Neurobiol. Aging* 33, 833.e39

Järviluoma, A., Strandin, T., Lülf, S., Bouchet, J., Mäkelä, A.R., Geyer, M., Benichou, S. & Saksela, K. (2012) "High-affinity target binding engineered via fusion of a single-domain antibody fragment with a ligand-tailored SH3 domain" *PloS one* 7, e40331

Jones, E.M., Dubey, M., Camp, P.J., Vernon, B.C., Biernat, J., Mandelkow, E., Majewski, J. & Chi, E.Y. (2012) "Interaction of tau protein with model lipid membranes induces tau structural compaction and membrane disruption" *Biochem.* 51, 2539-2550

Jumpertz, T., Rennhack, A., Ness, J., Baches, S., Pietrzik, C.U., Bulic, B. & Weggen, S. (2012) "Presenilin is the molecular target of acidic gamma-secretase modulators in living cells" *PloS one* 7, e30484

Kashikar, N., Alvarez, L., Seifert, R., Gregor, I., Jäckle, O., Beyermann, M., Krause, E. & Kaupp, U.B. (2012) "Temporal sampling, resetting, and adaptation orchestrate gradient sensing in sperm" *J. Cell. Biol.* 198, 1075-1091

Kaupp, U.B. (2012) "100 years of sperm chemotaxis" *J. Gen. Physiol.* 140, 583-586

Khalid, M., Yu, H.X., Sauter, D., Usmani, S.M., Schmökel, J., Feldman, J., Gruters, R. A., van der Ende, M.E., Geyer, M., Rowland-Jones, S., Osterhaus, A.D. & Kirchhoff, F. (2012) "Efficient Nef-mediated downmodulation of TCR-CD3 and CD28 is associated with high CD4(+) T cell counts in viremic HIV-2 infection" *J. Virol.* 86, 4906-4920

Körschen, H.G., Yildiz, Y., Raju, D.N., Schonauer, S., Boenigk, W., Jansen, V., Kremmer, E., Kaupp, U.B. & Wachten, D. (2012) "The non-iysosomal beta-glucosidase GBA2 is a non-integral membrane-associated protein at the ER and Golgi" *J. Biol. Chem.* 288, 3381-3393

Krüger, U., Wang, Y., Kumar, S. & Mandelkow, E.M. (2012) "Autophagic degradation of tau in primary neurons and its enhancement by trehalose" *Neurobiol. Aging* 33, 2291-2305

Kusch, J., Thon, S., Schulz, E., Biskup, C., Nache, V., Zimmer, T., Seifert, R., Schwede, F. & Benndorf, K. (2012) "How subunits cooperate in cAMP-induces activation of homotetrameric HCN2 channels" *Nature Chemical Biology* 8, 162-169

Mandelkow, E.M. (2012) "Reversibility of cognitive decline and synapse loss in regulatable mice with tau pathology" *Neurobiol. Aging* 33, S20-S20

Mandelkow, E.M. & Mandelkow, E. (2012) "Biochemistry and cell biology of tau protein in neurofibrillary degeneration" *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, a006247

Mangino, G., Serra, V., Borghi, P., Percario, Z.A., Horenkamp, F.A., Geyer, M. & Affabris, E. (2012) "Exogenous Nef induces proinflammatory signaling events in murine macrophages" *Viral Immunol.* 25, 117-130

Meuwissen, P.J., Stolp, B., Iannucci, V., Vermeire, J., Naessens, E., Saksela, K., Geyer, M., Vanham, G., Arien, K.K., Fackler, O.T. & Verhasselt, B. (2012) "Identification of a highly conserved valine-glycine-phenylalanine amino acid triplet required for HIV-1 Nef function" *Retrovirol.* 9, 1-19

Nache, V., Zimmer, T., Wongsamitkul, N., Schmauder, R., Kusch, J., Reinhardt, L., Bonigk, W., Seifert, R., Biskup, C., Schwede, F. & Benndorf, K. (2012) "Differential Regulation by cyclic nucleotides of the CNGA4 and CNGB1b subunits in olfactory cyclic nucleotide-gated channels" *Sci. Signal.* 5, ra48

Overbuschmann, J., Hengster, J., Irsen, S. & Wilhein, T. (2012) "Fabrication of Fresnel zone plates by ion-beam lithography and application as objective lenses in extreme ultraviolet microscopy at 13 nm wavelength" *Opt. Lett.* 37, 5100-5012

Palm, M., Engberding, N., Stein, F., Kelm, K. & Irsen, S. (2012) "Phases and evolution of microstructures in Ti-60 at.% Al" *Acta Mater.* 60, 3559-3569

Sapir, T., Frotscher, M., Levy, T., Mandelkow, E.M. & Reiner, O. (2012) "Taus role in the developing brain: implications for intellectual disability" *Hum. Mol. Genet.* 21, 1681-1692

Selkoe, D., Mandelkow, E. & Holtzman, D. (2012) "Deciphering Alzheimer Disease" *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* 4, a011460

St Amour, C.V., Sanso, M., Bösken, C. A., Lee, K. M., Larochelle, S., Zhang, C., Shokat, K. M., Geyer, M. & Fisher, R. P. (2012) "Separate domains of fission yeast Cdk9 (P-TEFb) are required for capping enzyme recruitment and primed (Ser7-Phosphorylated) Rpb1 carboxyl-terminal domain substrate recognition" *Mol. Cell. Biol.* 32, 2372-2383

Strünker, T. (2012) "A unique K^+-selective ion channel activated by a single cGMP molecule controls chemotaxis of sea urchin sperm" In: Morisawa, M. (ed.): *Sperm Cell Research in the 21st Century: Historical Discoveries to New Horizons* (Tokyo: Adthree Publishing Com Ltd), 142-145

Van der Jeugd, A., Hochgrafe, K., Ahmed, T., Decker, J.M., Sydow, A., Hofmann, A., Wu, D., Messing, L., Balschun, D., D'Hooge, R. & Mandelkow, E.M. (2012) "Cognitive defects are reversible in inducible mice expressing pro-aggregant full-length human Tau" *Acta Neuropathol.* 123, 787-805

Vaz, E., Dames, S.A., Geyer, M. & Brunsveld, L. (2012) "Positional screening and NMR structure determination of side-chain-to-side-chain cyclized beta(3)-peptides" *Org. Biomol. Chem.* 10, 1365-1373

Walter, A., Muzik, H., Vieker, H., Turchanin, A., Beyer, A., Golzhauser, A., Lacher, M., Steltenkamp, S., Schmitz, S., Holik, P., Kuhlbrandt, W. & Rhinow, D. (2012) "Practical aspects of Boersch phase contrast electron microscopy of biological specimens" *Ultramicroscopy* 116, 62-72

Xu, K., Ranjith, R., Laha, A., Parala, H., Milanov, A. P., Fischer, R. A., Bugiel, E., Feydt, J., Irsen, S., Toader, T., Bock, C., Rogalla, D., Osten, H. J., Kunze, U. & Devi, A. (2012) "Atomic layer deposition of Gd2O3 and Dy2O3: a study of the ALD characteristics and structural and electrical properties" *Chem. Mater.* 24, 651-658

Zempel, H. & Mandelkow, E.M. (2012) "Linking amyloid-beta and tau: amyloid-beta induced synaptic dysfunction via local wreckage of the neuronal cytoskeleton" *Neurodegener. Dis.* 10, 64-72

Zahlen und Fakten

Personal

Personalstruktur

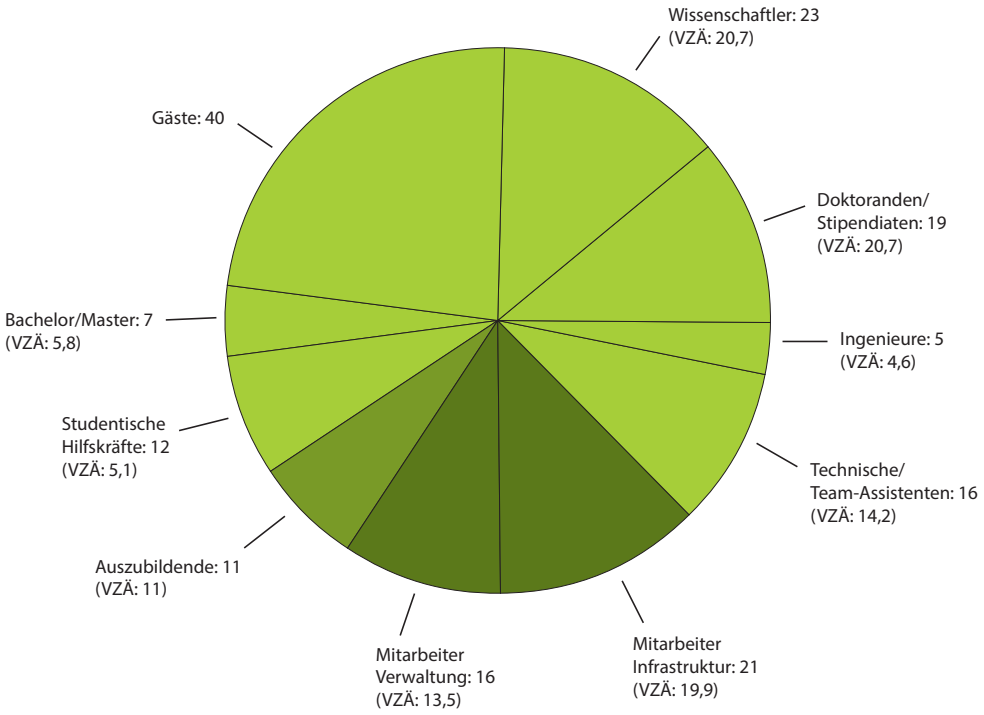
Bei der Stiftung caesar waren zum 1.1.2013 insgesamt 170 Personen beschäftigt (130 caesar-Mitarbeiter/innen und 40 Gastwissenschaftler/innen). Das Vollzeitäquivalent lag bei 113,7 Stellen. Die Mitarbeiterzahl ist in 2012 um 16 angestiegen (5 Wissenschaftler/innen, 4 Doktoranden/innen, 1 Ingenieur, 7 Bachelor/Master-Studenten/innen).

Damit setzt sich der Personalzuwachs von caesar kontinuierlich weiter fort:

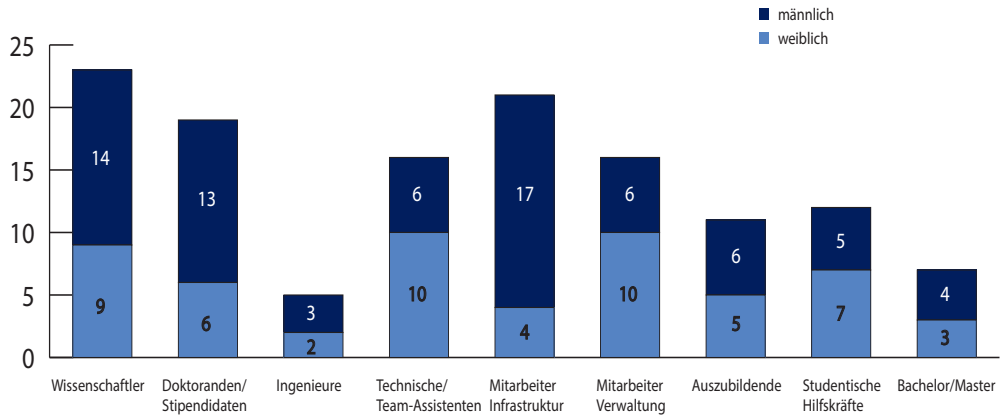
1.1.2010:	105 Personen
1.1.2011:	120 Personen
1.1.2012:	155 Personen

Die Verteilung der Mitarbeiter/innen auf die einzelnen Funktionsbereiche ergibt sich aus der unten stehenden Grafik. Danach sind 122 der Mitarbeiter/innen im wissenschaftlichen Bereich, 16 in der Verwaltung und 21 in der Infrastruktur beschäftigt. Ferner bildet caesar noch 11 Auszubildende in sechs Bereichen aus.

Mitarbeiter/innen nach Funktionen, Stand: 01.01.2013



Bei der folgenden Auswertung sind die Gastwissenschaftler/innen (40) nicht berücksichtigt. Caesar konnte den Anteil der weiblichen Beschäftigten im vergangenen Jahr halten. 43,7 % der Mitarbeiter sind weiblich. Insbesondere im wissenschaftlichen Bereich ist geplant, diesen Anteil noch weiter zu erhöhen. Die Aufteilung von weiblichen und männlichen Mitarbeitern, bezogen auf die einzelnen Funktionsbereiche, ist in der unten stehenden Grafik dargestellt.



Caesar hält seine Ausbildungsbemühungen auf hohem Niveau und hatte in den letzten zwei Jahren mehrere Auszubildende, die als Kammerbeste vor der IHK ihre Prüfungen abgelegt haben. Die Gesamtzahl der Studenten/innen, Auszubildenden und Doktoranden/innen beträgt 37. Sie stellen damit mehr als ein Viertel aller Beschäftigten.

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-Ausgleichs, 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 bei caesar.

Vermögen	
Sachanlagen	88.285.857 €
Finanzanlagen	296.907.114 €
Sonstige	21.840.416 €
Bilanzsumme	**407.033.387 €**

Erträge 2012	
Erträge aus Umsatzerlösen und Förderprojekten	3.212.508 €
Erträge aus Wertpapieren und Zinsen	11.147.399 €
Erträge insgesamt	**14.359.907 €**

Aufwendungen 2012	
Personalaufwand	5.490.100 €
Sachaufwand	4.937.377 €
Abschreibungen	2.568.160 €
Aufwendungen insgesamt	**12.995.637 €**

Jahresbilanz 2012

Bilanzabschluss zum 31. Dezember 2012 (Angaben in €)

Aktiva	31.12.2012	31.11.2011
A. Anlagevermögen		
I. Immaterielle Vermögensgegenstände	**109.279**	**101.963**
II. Sachanlagen		
Grundstücke & Bauten *)	72.302.337	72.236.120
Andere Anlagen	15.929.550	17.837.437
Geleistete Anzahlungen & Anlagen im Bau	53.970	43.661
Summe aus II.	**88.285.857**	**90.117.218**
III. Finanzanlagen		
Beteiligungen	155.625	160.625
Wertpapiere des Anlagevermögens zur Anlage des Stiftungsvermögens	292.148.269	292.148.269
Wertpapiere des Anlagevermögens zur Gebäudewiederbeschaffung	4.603.220	3.827.116
Summe aus III.	**296.907.114**	**296.136.010**
Summe für A.	**385.302.250**	**386.355.191**
B. Umlaufvermögen		
I. Vorräte	**259.498**	**251.901**
II. Forderungen und sonstige Vermögensgegenstände		
Forderungen aus Lieferungen und Leistungen	155.444	1.000.337
Forderungen gegen Unternehmen, mit denen ein Beteiligungsverhältnis besteht	1.198	18.457
Sonstige Vermögensgegenstände	1.185.299	2.125.751
Summe aus II.	**1.341.941**	**3.144.545**
III. Wertpapiere	**12.500.000**	**5.500.000**
IV. Kassenbestand, Bundesbankguthaben, Guthaben bei Kreditinstituten und Schecks	**7.417.966**	**12.008.496**
Summe für B.	**21.519.405**	**20.904.942**
C. Rechnungsabgrenzungsposten	**211.732**	**170.084**
Gesamtes Vermögen	**407.033.387**	**407.430.217**

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

Passiva	31.12.2012	31.11.2011
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	5.868.436	5.004.165
Instandhaltungsrücklage *)	3.443.788	2.943.788
Summe aus II.	**9.312224**	**7.947953**
III. Ergebnis		
Jahresüberschuss/-fehlbetrag	0	0
Summe aus III.	**0**	**0**
Summe für A.	**400.746.142**	**399.381.872**
B. Sonderposten aus Investitionszuschüssen	**5.409.203**	**5.859.759**
C. Rückstellungen	**407.651**	**223.070**
D. Verbindlichkeiten		
Verbindlichkeiten aus Lieferungen und Leistungen	375.775	1.463.248
Sonstige Verbindlichkeiten	92.276	475.224
Summe für D.	**468.051**	**1.938.473**
E. Rechnungsabgrenzungsposten	**2.340**	**27.043**
Gesamtes Vermögen	**407.033.387**	**407.430.217**

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

Organe der Stiftung

Stiftungsrat

Zum 31.12.2012 war der Stiftungsrat wie folgt zusammengesetzt:

Vorsitzender

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

Mitglieder

MinDir'in Bärbel Brumme-Bothe
Leiterin der Abteilung 6 im Bundesministerium für Bildung und Forschung

Staatssekretär Helmut Dockter
Ministerium für Innovation, Wissenschaft und Forschung des Landes NRW

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

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

Prof. Dr. Regine Kahmann
Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie

Dr. rer. nat. Stefan Marcinowski
Vizepräsident der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V.

Jürgen Nimptsch
Oberbürgermeister der Bundesstadt Bonn

Prof. Dr. Wolfgang Plischke
Bayer AG

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. Petra Schwille
Max-Planck-Institut für Biochemie

Prof. Dr. Martin Stratmann
Vizepräsident der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V.,
Max-Planck-Institut für Eisenforschung GmbH

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

Vorstand

Zum 31.12.2012 war der Vorstand wie folgt zusammengesetzt:

Wissenschaftlicher Direktor

Prof. Dr. Ulrich Benjamin Kaupp

Kaufmännische Geschäftsführerin

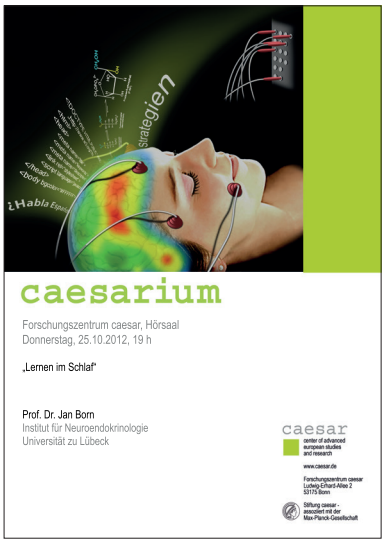
Gertrud Bilski

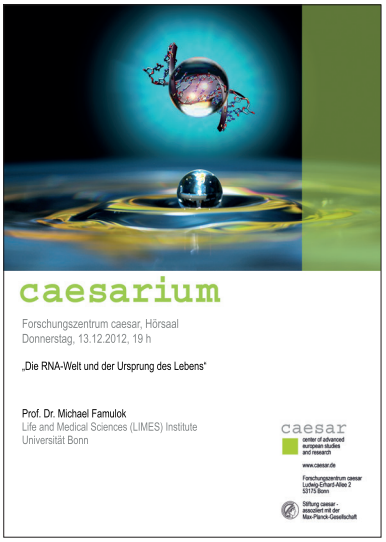
caesarium

caesar möchte mit dem *caesarium* zeigen, wie spannend und faszinierend Wissenschaft und Forschung sein können. Die Vorträge richten sich nicht (nur) an ein Fachpublikum, sondern gerade an interessierte Laien. Im Jahr 2012 fanden die folgenden *caesarien* statt:

Prof. Dr. Henrik Mouritsen
Institut für Biologie und Umweltwissenschaften
Universität Oldenburg
Magnetrezeption bei Vögeln - der sechste Sinn
28.06.2012

Prof. Dr. Jan Born
Lehrstuhl für Medizinische Psychologie
Universität Tübingen
Lernen im Schlaf
25.10.2012





Prof. Dr. Michael Famulok
Life & Medical Sciences Institute (LIMES)
Universität Bonn
Die RNA-Welt und der Ursprung des Lebens
13.12.2012

Impressum

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

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

Textlayout
Stefan Hartmann

Bildbearbeitung
Dr. Corinna Bernsdorff

Cover
Felix von Cube

Dargestellt sind die Wechselwirkungen einer elektromagnetischen Welle mit den Leitungsbandelektronen eines sogenannten Metamaterials (Plasmonen; siehe Forschungsbericht auf Seite 39).

Druck
Brandt GmbH
Rathausgasse 13
53111 Bonn

© 2013 Stiftung caesar
Ludwig-Erhard-Allee 2
D-53175 Bonn
Tel.: +49 (0)228 9656-0
Fax: +49 (0)228 9656-111
E-Mail: office@caesar.de
http://www.caesar.de