

SPEKTRUM

 UNIVERSITÄT
BAYREUTH

12. JAHRGANG • AUSGABE 2 • NOVEMBER 2016

BIOMEDIZIN

Vom Naturstoff zum Wirkstoff

SEITEN 14-17

MOLEKULARBIOLOGIE

Licht revolutioniert die Biologie

SEITEN 36-39

MOLEKULARE ÖKOLOGIE

Orchideen als Feinschmecker

SEITEN 76-79

THEMA

Molekulare Biowissenschaften

Liebe Leserinnen und Leser,



Prof. Dr. Stefan Leible,
Präsident der Universität
Bayreuth.

In dieser neuen SPEKTRUM-Ausgabe erwartet sie eine breite Vielfalt von Themen – vielversprechende Forschungsansätze für die Biomedizin, überraschende Einblicke der Molekularbiologie und spannende Forschungsvorhaben aus der Molekularen Ökologie, die für den Naturschutz und den Klimawandel bedeutsam sind. Die Beiträge bieten Einblicke in das vielfältige ‚Netzwerk der Natur‘, das – für das menschliche Auge oft unsichtbar – scheinbar weit entfernte Gebiete der Forschung verknüpft.

Diese Zusammenhänge spiegeln sich auch im Profilfeld „Molekulare Biowissenschaften“ an der Universität Bayreuth wider, das unterschiedliche naturwissenschaftliche Disziplinen verbindet. Hier, wie in allen Bereichen von Forschung und Lehre, wollen wir als junge Campusuniversität Synergien ermöglichen, aus denen neue Forschungsideen, grundlegende Erkenntnisse und nicht selten auch innovative Anwendungen hervorgehen. Dieses inspirierende Umfeld trägt wesentlich auch zur internationalen Sichtbarkeit unserer Universität bei und fördert unseren weltweiten Austausch mit namhaften Partneereinrichtungen.

Eine besondere Herzensangelegenheit ist uns dabei die Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses. Wir möchten unseren Promovenden exzellente Voraussetzungen bieten, damit sie selbstständig und im engen Kontakt mit erfahrenen Wissenschaftlern eigene Forschungsinteressen entwickeln können – sei es im Rahmen einer Individualpromotion oder als Mitglieder eines Graduiertenzentrums, zum Beispiel der Bayreuther Graduiertenschule für Mathematik und Naturwissenschaften BayNAT. Und auch unsere Studierenden in den oft fächerübergreifend angelegten Masterstudiengängen können sich in aktuelle Forschungsarbeiten einbringen. Die folgenden Beiträge zeigen Beispiele für diese engen Kontakte zwischen den verschiedenen Forschergenerationen auf unserem Campus.

Viel Freude mit unserer neuen SPEKTRUM-Ausgabe

wünscht Ihnen

Ihr

Prof. Dr. Stefan Leible
Präsident der Universität Bayreuth

Weitere SPEKTRUM-Ausgaben

Auf der Homepage der Universität Bayreuth finden Sie unter anderem auch die vorigen SPEKTRUM-Ausgaben zu den folgenden Themen:

- 1/2016: Innovationen
- 2/2015: Digitalisierung
- 1/2015: Kulturbegegnungen und transkulturelle Prozesse
- 2/2014: Energie
- 1/2014: Recht und Moral
- 1/2013: Lebensmittel- und Gesundheitswissenschaften

- www.uni-bayreuth.de/de/universitaet/presse/spektrum

Grundlagenforschung ist in erster Linie getrieben durch Faszination, Neugierde und dem Bestreben der Forschenden, bislang unverstandene Phänomene in ihrer Funktionsweise aufzuklären. Jedoch liefert uns die Grundlagenforschung nicht nur bloßen Erkenntnisgewinn. Wie wir aus vielen Beispielen der Vergangenheit wissen, sind die bedeutendsten technologischen Innovationen und Revolutionen „zufälligen“ Entdeckungen zu verdanken, bei denen die Wissenschaft die nutzbringenden Anwendungen ihrer Untersuchungen noch nicht vor Augen hatte und diese sich oft erst Monate oder Jahre später zeigten. Das trifft in ganz besonderem Maße auf die Molekulare Biowissenschaften zu, bei denen die Lösungen großer Probleme meist nicht die Antwort auf die erste Forschungsfrage waren und sind. Aus diesem Grunde fördern Politik und Gesellschaft die Grundlagenforschung dieser Disziplinen mit zum Teil erheblichen Mitteln – sie tun dies aus Weitsicht und Klugheit.

In Bayreuth bilden die Molekulare Biowissenschaften seit vielen Jahren einen Schwerpunkt in Forschung und Lehre, der Biochemie und Molekularbiologie verbindet. Weitere Kompetenzen sind darin einbezogen – aus anderen biologischen Disziplinen, aus der Chemie, der Physik und auch den Ingenieurwissenschaften. Schon das Inhaltsverzeichnis auf der folgenden Seite macht die Vielfalt

der Themen sichtbar, die in diesem multi- und interdisziplinären Profildfeld der Universität Bayreuth bearbeitet werden. Diese SPEKTRUM-Ausgabe möchte Ihnen einen Eindruck davon vermitteln, wie unser junger Campus auf vielen Forschungsfeldern daran mitwirkt, zu neuen Erkenntnissen über die „Bausteine des Lebens“ vorzudringen. Ihre Lektüre soll einerseits Interesse und Begeisterung für die kreative Forschung in Bayreuth wecken, andererseits aber auch deren mögliche zukünftige Anwendungen aufzeigen.

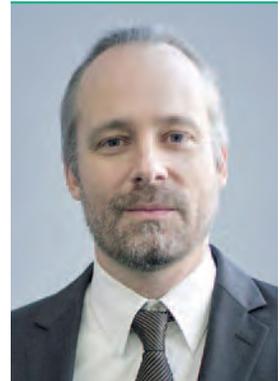
Viel Freude beim Lesen wünschen Ihnen Ihre



Professor Dr. Christian Laforsch
Vizepräsident der Universität Bayreuth
für Forschung und wissenschaftlichen Nachwuchs.



Professor Dr. Olaf Stemmann
Sprecher des Profildfelds „Molekulare Biowissenschaften“ an der Universität Bayreuth.



Prof. Dr. Christian Laforsch
ist Inhaber des Lehrstuhls
Tierökologie I an der Universität
Bayreuth.



Prof. Dr. Olaf Stemmann
ist Inhaber des Lehrstuhls
für Genetik an der Universität
Bayreuth.

IMPRESSUM

Spektrum-Magazin der Universität Bayreuth

AUFLAGE:
2.000 Stück

HERAUSGEBER:
Universität Bayreuth
Stabsabteilung Presse, Marketing
und Kommunikation (PMK)
95440 Bayreuth
Telefon (09 21) 55 - 53 56 / - 53 24
Telefax (09 21) 55 - 53 25
pressestelle@uni-bayreuth.de

REDAKTIONSLEITUNG:
Christian Wißler (V.i.S.d.P.)

DRUCK:
bonitasprint gmbh, Würzburg

SATZ UND LAYOUT:
GAUBE media agentur, Bayreuth
Telefon (09 21) 5 07 14 41
spektrum@gaube-media.de

BILDQUELLEN-KENNZEICHNUNG:
sst: www.shutterstock.com



Christian Wißler M.A.,
Fachwirt Public Relations
(BAW), Stabsabteilung PMK
der Universität Bayreuth,
Wissenschaftskommunikation.

Alle Beiträge sind bei Quellenangaben und Belegexemplaren frei zur Veröffentlichung.

Titelseite: Digitale Illustration
der DNA-Struktur (sst).

Abb. links: Abstrakte Illustration
einer Molekülstruktur (sst).

Molekulare Biowissenschaften



2 **Grußwort**
Prof. Dr. Stefan Leible
Präsident der Universität Bayreuth

3 **Editorial**
Prof. Dr. Christian Laforsch,
Vizepräsident der Universität
Bayreuth für Forschung und
wissenschaftlichen Nachwuchs,
und Prof. Dr. Olaf Stemmann,
Sprecher des Profilsfelds
„Molekulare Biowissenschaften“
an der Universität Bayreuth

3 **Impressum**

4 **Inhaltsverzeichnis**

BIOMEDIZIN

6 **An den Schaltern der Gene**
RNA im Fokus der
biomedizinischen Forschung

10 **Maßgeschneiderte Proteine**
Wie die Biowissenschaften den
,Baukasten der Natur‘ weiter-
entwickeln

14 **Vom Naturstoff zum Wirkstoff**
Wie die Biosyntheseforschung
neue Ansätze in der Biomedizin
und der Biotechnologie fördert

18 **Auf dem Weg zu neuen
Krebstherapien**
Neuartige Wirkstoffe lassen
Tumore verhungern und ersticken

22 **Forschung gegen AIDS**
Neuartige Wirkstoffe hemmen das
Humane Immundefizienzvirus (HIV)

26 **Weißer Blutkörperchen kultivieren**
Auf dem Weg zum bioartificialen
lymphatischen Gewebe

30 **Von Zellkulturen bis zu
hochwertigen Implantaten**
Eine biomedizinische Plattform
für die Universität Bayreuth



Für die Biomedizin von großem Interesse:
Die Projekte der Bayreuther Nachwuchsforscher-
gruppe im Elitenetzwerk Bayern (Foto: C. Wißler).

MOLEKULARBIOLOGIE

36 **Optogenetik:**
Licht revolutioniert die Biologie
Photorezeptoren ermöglichen
innovative Anwendungen in den
Lebenswissenschaften



Elektronenmikroskope bieten Einblicke in feinste
Zellstrukturen (Bild: R. Grotjahn und B. Westermann).

40 **Biochemische Physik**
Mit Physik und Chemie den
Molekülen des Lebens auf der Spur

44 **Elektronenmikroskopie**
Einblicke in die Nanowelt der Zellen

48 **Das Ballett der Chromosomen**
Neue Erkenntnisse zur
Choreographie der Zellteilung

52 **Fisch und Mensch**
Ein kleines Molekül steuert die
Entwicklung von Extremitäten



Forschungsarbeiten an einem Transmissionselektronenmikroskop (TEM) auf dem Bayreuther Campus (Foto: P. Kolb).

- 72 Kulturpflanzen für den Klimawandel fit machen**
Wie die Genetik dazu beiträgt, dass Pflanzen Überflutungen überstehen
- 76 Orchideen als Feinschmecker**
Unterirdische Dreiecksbeziehungen sichern die Ernährung mit Trüffeln



Die Kulturpflanze Raps ist hochempfindlich gegenüber Überflutungen, wie sie im Zuge des Klimawandels häufiger zu erwarten sind (Foto: C. Wißler).

72



Von entwicklungsbiologischen Untersuchungen an Fischen lässt sich auch etwas über den Menschen lernen (Foto: P. Kolb).

52

- 56 Mikroben mit Kompass**
Wie Bakterien magnetische Organellen herstellen
- 60 Die Schwarze Witwe und ihre Künste**
Bayreuther Wissenschaftler entschlüsseln Molekülstrukturen und Teile des Assemblierungsmechanismus der Spinnenseide
- 64 Den „guten“ und „bösen“ Metallen auf der Spur**
Bayreuther Forschung an Mikroelementen in Pflanzen

- 80 Körper-, Nest- und Nahrungshygiene**
Strategien zur Immunabwehr außerhalb des Körpers

- 84 Mikroplastik im Süßwasser**
Eine Herausforderung für Wissenschaft und Gesellschaft
- 88 Grüne Inseln der Evolution**
Ostafrikanische Heuschreckenarten im Wandel von Landschaft und Klima



Die Erforschung von Heuschreckenarten ist für die Vegetationsgeschichte Ostafrikas aufschlussreich (Foto: C. Hemp).

88



Was tun Ameisen, Hummeln und andere Insekten, um sich gegen Krankheitserreger zu schützen? (Foto: P. Kolb).

80

MOLEKULARE ÖKOLOGIE

- 68 Molekulargenetische Analysen**
Was Forschungsrichtungen verbindet – von der Physiologie bis zur Ökologie



■ CLAU KUHNN

An den Schaltern der Gene

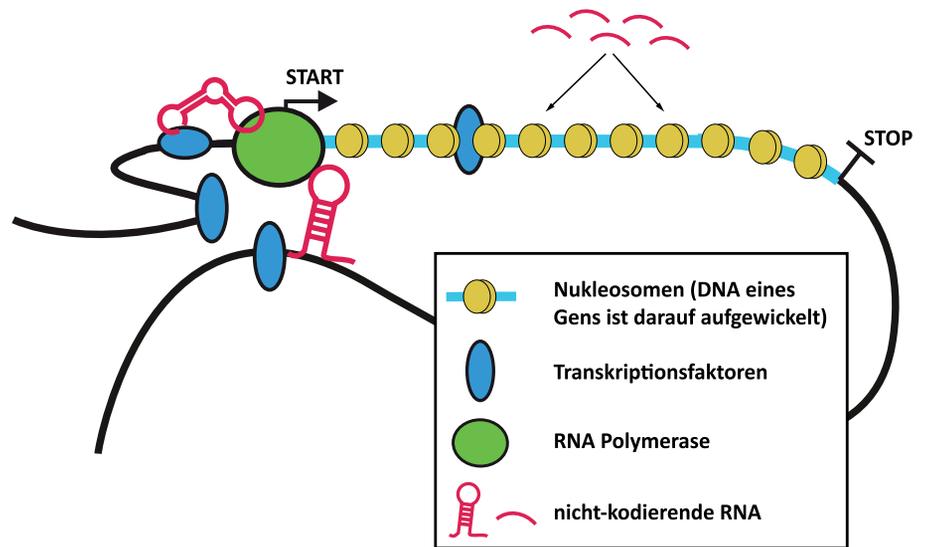
RNA IM FOKUS DER BIOMEDIZINISCHEN FORSCHUNG

■ Doktorandin Iana Kim M.Sc. und Master-Student Martin Kuric B.Sc. bereiten Experimente vor, bei denen DNA aus Planarien isoliert wird (Foto: Christian Wißler).

Jeder Mensch besteht aus einer Vielzahl von Zellen, die sich hinsichtlich ihrer Funktion und Gestalt unterscheiden. Trotz dieser enormen Unterschiede besitzt jede unserer Zellen eine identische Kopie unserer gesamten genetischen Information. Theoretisch könnte sich also jede unserer Zellen in jede andere Zelle verwandeln. Aber in der Praxis ist dies bei den allermeisten Zellen nicht der Fall. Denn im Laufe ihrer Entwicklung wird ein einziges Mal – und zwar unumkehrbar – entschieden, in welchen Zelltyp sich die jeweilige Zelle entwickelt. Eine Ausnahme von dieser Regel machen pluripotente Stammzellen, die in vielen unserer Organe vorkommen. Sie sind in der Lage, sich in verschiedene Zelltypen *innerhalb* eines bestimmten Organs zu entwickeln. Pluripotente Stammzellen können sich jedoch nicht in Zellen anderer Organe differenzieren. Diese Fähigkeit ist embryonalen Stammzellen vorbehalten. Aus ethischen Gründen sind Forschungsarbeiten an diesen speziellen Stammzellen in Deutschland und vielen anderen Ländern verboten. Daher greift die Forschung hier auf Modellsysteme zurück, um zu einem vertieften Verständnis embryonaler Stammzellen vorzudringen.

Die Entscheidung, in welche Körperzelle sich eine Stammzelle entwickelt, wird größtenteils von Transkriptionsfaktoren bestimmt. Dies sind Proteine (Eiweiße), die an die DNA – in der alle Erbinformationen des Menschen enthalten sind – andocken. Die DNA besteht allerdings nicht nur aus Genen. Es sind auch andere molekulare Abschnitte darin enthalten, die sich in unmittelbarer Nähe der Gene befinden und regulierende Regionen genannt werden. Sie haben einen entscheidenden Einfluss darauf, ob und in welcher Weise die Gene abgelesen werden. Die Transkriptionsfaktoren binden an genau diese Bereiche der DNA. Damit lösen sie einen komplexen Vorgang aus, der die zur Ablesung der Gene erforderliche Maschinerie schrittweise aufbaut und für diese Aufgabe startklar macht.

Am Ende dieses Vorgangs werden eine Reihe von Enzymen – die RNA Polymerasen – aktiviert. Diese sind dafür zuständig, die aus der DNA abgelesene genetische Information in der Zelle zu nutzen, um Ribonukleinsäuren (RNAs) zu produzieren. RNAs eines bestimmten Typs, die Boten-RNAs, enthalten die Informationen für die nachfolgende Herstellung von Proteinen, den Bausteinen des Lebens. Biochemisch ausgedrückt: Die Boten-RNAs kodieren. Der gesamte Prozess, der vom Ablesen der



Gene bis zur Proteinsynthese führt, wird als Genexpression bezeichnet.

Abb. 1: Nicht-kodierende RNA spielt bei allen Schritten des Ablesens von menschlichen Genen eine Rolle (Grafik: Claus Kuhn).

DIE TRANSKRIPTIONSFAKTOREN: ALLEINHERRSCHER ÜBER DIE GENE?

Viele Jahre lang ist die Forschung davon ausgegangen, dass die Transkriptionsfaktoren von vornherein festlegen, wie die Genexpression verläuft und zu welchen Ergebnissen sie führt. Man glaubte, dass sie allein entscheiden, welche Gene zu welchem Zeitpunkt und in welcher Stärke abgelesen werden. Und dass sie folglich auch darüber bestimmen, welche Proteine in welcher Anzahl letztlich in der Zelle entstehen. Diese Lehrmeinung wurde durch die Erkenntnis bestärkt, dass Transkriptionsfaktoren tatsächlich eine wichtige Rolle bei der Entstehung vieler Krankheiten spielen. Doch nach 2007 ließ sie sich nicht länger aufrechterhalten. Denn in jenem Jahr gelang es dank hochleistungsfähiger Computer- und Big data-Verfahren erstmals, alle Bindestellen von Transkriptionsfaktoren genau zu identifizieren. Der daraus resultierende enorme Erkenntnisgewinn führte zu einem vertieften Verständnis der Prozesse, die das Ablesen unserer Gene steuern, fördern, schwächen oder verhindern. In ihrer Gesamtheit bilden diese Prozesse die sogenannte Genregulation (Abb. 1).

Mit den neuen Verfahren, insbesondere dem Next Generation Sequencing (NGS), wurde sehr bald klar: Die Bindung von Transkriptionsfaktoren allein erlaubt nur bedingt Aussagen darüber, wie sich die Genregulation im Einzelnen gestaltet. Seitdem steht die Forschung vor der Herausforderung, nach weiteren Bausteinen zu suchen, die aktiv daran beteiligt sind.



Abb. 2: RNA wird auf ein Harnstoff-Gel geladen (Foto: Christian Wißler).

AUTOR



Dr. Claus Kuhn ist Leiter der Nachwuchsforschergruppe „Genregulation durch nicht-kodierende RNA“ im Elitenetzwerk Bayern an der Universität Bayreuth.

Abb. 3 (rechts): Doktorand Felix Klatt M.Sc. bei der Aufreinigung der Kinase CDK8 (Foto: Christian Wißler).

Abb. 4: Silke Spudeit BTA bei der sterilen Arbeit mit Insektenzellen (Foto: Christian Wißler).

NICHT-KODIERENDE RNAs ALS WICHTIGE BAUSTEINE DER GENREGULATION

Um das Jahr 2000 hatte man entdeckt, dass Boten-RNAs – auch messengerRNAs (mRNAs) genannt – nicht der einzige Typ von RNAs sind, die in der Zelle erzeugt werden. In den Folgejahren stellte sich heraus, dass es auch RNAs gibt, die keine genetischen Informationen und mithin keine Baupläne für Proteine enthalten. Heute steht fest, dass diese ‚nicht-kodierenden RNAs‘ die Gene des Menschen dennoch auf viele unterschiedliche Arten beeinflussen:

- microRNAs sind in der Lage, viele verschiedene Boten-RNAs zu erkennen und deren Abbau einzuleiten. Dieser Abbau ist für die Zelle wichtig, damit sie schnelle Entwicklungsentscheidungen treffen kann.
- Zudem wurden weitere Klassen von nicht-kodierenden RNAs entdeckt, die offensichtlich lebenswichtige Funktionen übernehmen. Wenn man die Entstehung dieser RNAs blockiert, sterben die betroffenen Zellen oder der gesamte Organismus.

Die Forschungsgruppe um Dr. Claus Kuhn an der Universität Bayreuth hat sich vor diesem Hintergrund das Ziel gesetzt, die Wirkungsweise nicht-kodierender RNAs aufzuklären – insbesondere solcher RNAs, über die man bisher so gut wie nichts weiß.¹ Die Forschungsergebnisse werden dazu

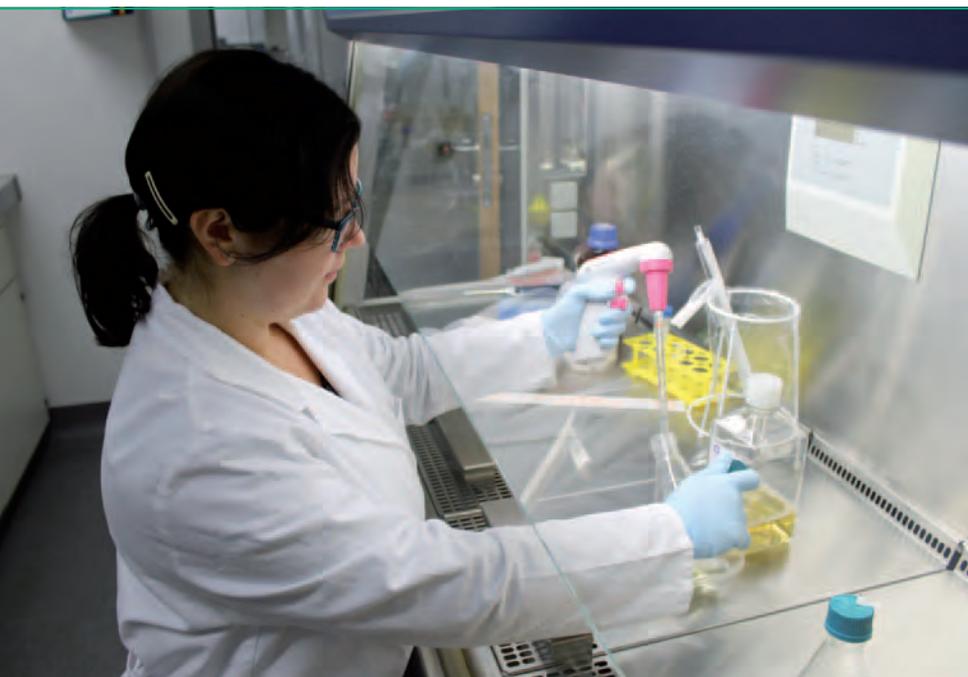


beitragen können, neuartige Medikamente gegen Krankheiten zu entwickeln, die durch Fehlfunktionen von RNAs verursacht sind. Diese Medikamente werden höchstwahrscheinlich nicht klassisch aus kleinen chemischen Molekülen oder aus Proteinen bestehen, sondern selbst RNAs sein. Da in den nächsten Jahren die Zulassung vieler RNA-basierter Wirkstoffe bevorsteht, sind Fortschritte in diese Richtung keine ferne Zukunftsmusik, sondern in unmittelbarer Reichweite.

Die beiden folgenden Bayreuther Projekte veranschaulichen das große Potenzial dieser Forschungsarbeiten für die Biomedizin:

TUMORE WIRKSAM BEKÄMPFEN

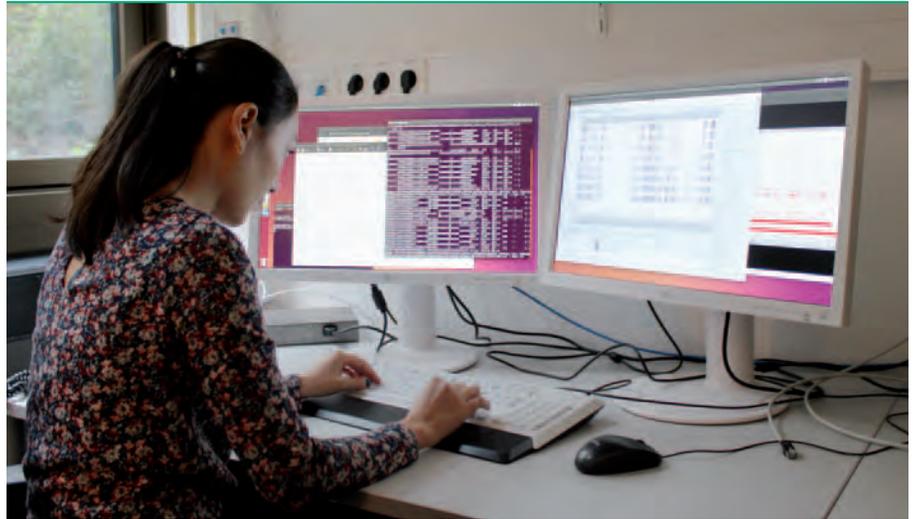
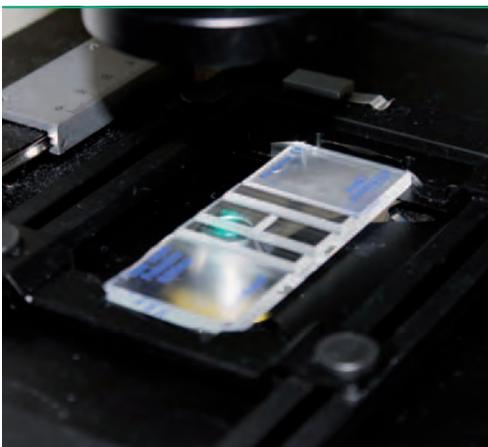
Kinasen sind Proteine, die in der Lage sind, andere Proteine präzise zu modifizieren. Diese Zielproteine verändern dadurch ihre Funktion: Ihre Aktivität wird erhöht oder gesenkt und reguliert wichtige Vorgänge in der Zelle. Viele Kinasen sind so an der indirekten Steuerung lebenswichtiger Prozesse, zum Beispiel der Teilung von Zellen, beteiligt. Die Wirkungsweisen der einzelnen Kinasen ist sehr unterschiedlich, aber hinsichtlich ihrer 3-dimensionalen Strukturen ähneln sich die Kinasen sehr stark. Diese strukturelle Verwandtschaft macht es außerordentlich schwierig, nur eine einzige Kinase durch einen Wirkstoff zu beeinflussen, ohne dabei viele andere Kinasen ungewollt zu treffen.



Eine wichtige menschliche Kinase, CDK8, ist an der Entstehung von Darmkrebs und anderen Krebsarten beteiligt. Sie scheint zudem eine unrühmliche Rolle bei der Ausbildung von Resistenzen gegen Chemotherapien zu spielen. CDK8 ist Teil eines großen Proteinkomplexes, der Mediator genannt wird und einen direkten Einfluss auf das Zellwachstum hat. An diesen Komplex binden auch Tausende nicht-kodierender RNAs. Die Forschungsgruppe um Dr. Claus Kuhn versucht daher genauer zu verstehen, wie nicht-kodierende RNAs an CDK8 binden und zusammen mit anderen Proteinen die Aktivität von CDK8 beeinflussen. Für die Untersuchung dieser molekularen Zusammenhänge haben die Techniken und Verfahren der Strukturbioogie eine zentrale Bedeutung. Die zu erwartenden Forschungsergebnisse werden eine wertvolle Grundlage bieten, um Wirkstoffe zu entwerfen, welche die Kinase CDK8 zielgenau hemmen und damit das Wachstum von Tumoren stoppen.

DIE REGENERATION VON ORGANEN STEuern

Für Menschen und die meisten anderen Lebewesen ist es nach dem Abschluss ihrer Embryonalentwicklung nicht mehr möglich, ganze Organe aus einzelnen Stammzellen neu zu formen. Für erwachsene Süßwasser-Planarien ist dies jedoch kein Traum, sondern Realität (Abb. 7). Sie verdanken ihre Regenerationsfähigkeit einer Vielzahl von pluripotenten Stammzellen, die in ihrem ganzen Körper verteilt sind. Diese sind in der Lage, jedwedes Organ des erwachsenen Körpers nachzubilden. Die Regenerationsfähigkeit von Planarien ist so robust, dass selbst amputierte Fragmente eines Wurmes, die nur ein Hundertstel des erwachsenen Organismus ausmachen, zu vollständigen Tieren heranwachsen können. Diese wahrhaft märchenhaften Fähigkeiten werden durch eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren gesteuert. Im Jahre 2005 wurde zugleich klar, dass auch nicht-kodierende RNAs, sogenannte piRNAs, bei diesem Prozess eine entscheidende Rolle spielen.



„BRÜCKEN ZU SCHLAGEN ZWISCHEN DER DATENFÜLLE, DIE WIR MIT BIOCHEMISCHEN HOCHDURCHSATZMETHODEN ERHALTEN, UND DEN MOLEKULAREN MECHANISMEN, DIE DER ORGANREGENERATION, DEN GEHIRNFUNKTIONEN UND DER KREBSENTSTEHUNG ZUGRUNDE LIEGEN – DIES STEHT BEI DEN PROJEKTEN DER BAYREUTHER NACHWUCHSFORSCHERGRUPPE IM ELITENETZWERK BAYERN IMMER IM VORDERGRUND.“

Dr. Claus Kuhn

Die Bayreuther Forschungsgruppe will daher herausfinden, wie die piRNAs es schaffen, dass erwachsene Planarien ihre Regenerationsfähigkeit nicht verlieren. Dabei gehen die Wissenschaftler der Hypothese nach, dass die piRNAs eine Vielzahl von Genen in Stammzellen steuern. Trifft dies zu, dann trägt diese Steuerung wesentlich dazu bei, dass wenige Stammzellen ausreichen, um den gesamten Körper nach einer Verwundung oder nach dem Verlust zahlreicher Körperteile wieder aufzubauen. Sobald feststeht, welche Gene von den piRNAs gesteuert werden, können die Erkenntnisse möglicherweise in der Biomedizin angewendet werden. Beim Menschen ist es noch immer sehr schwierig, ein Organ aus einer überschaubaren Zahl an Stammzellen wachsen zu lassen. Die bisherigen Forschungen zu nicht-kodierenden RNAs geben aber Anlass zu der Hoffnung, dass weitere Erkenntnisfortschritte es eines Tages ermöglichen, die gezielte Organregeneration besser steuern zu können.

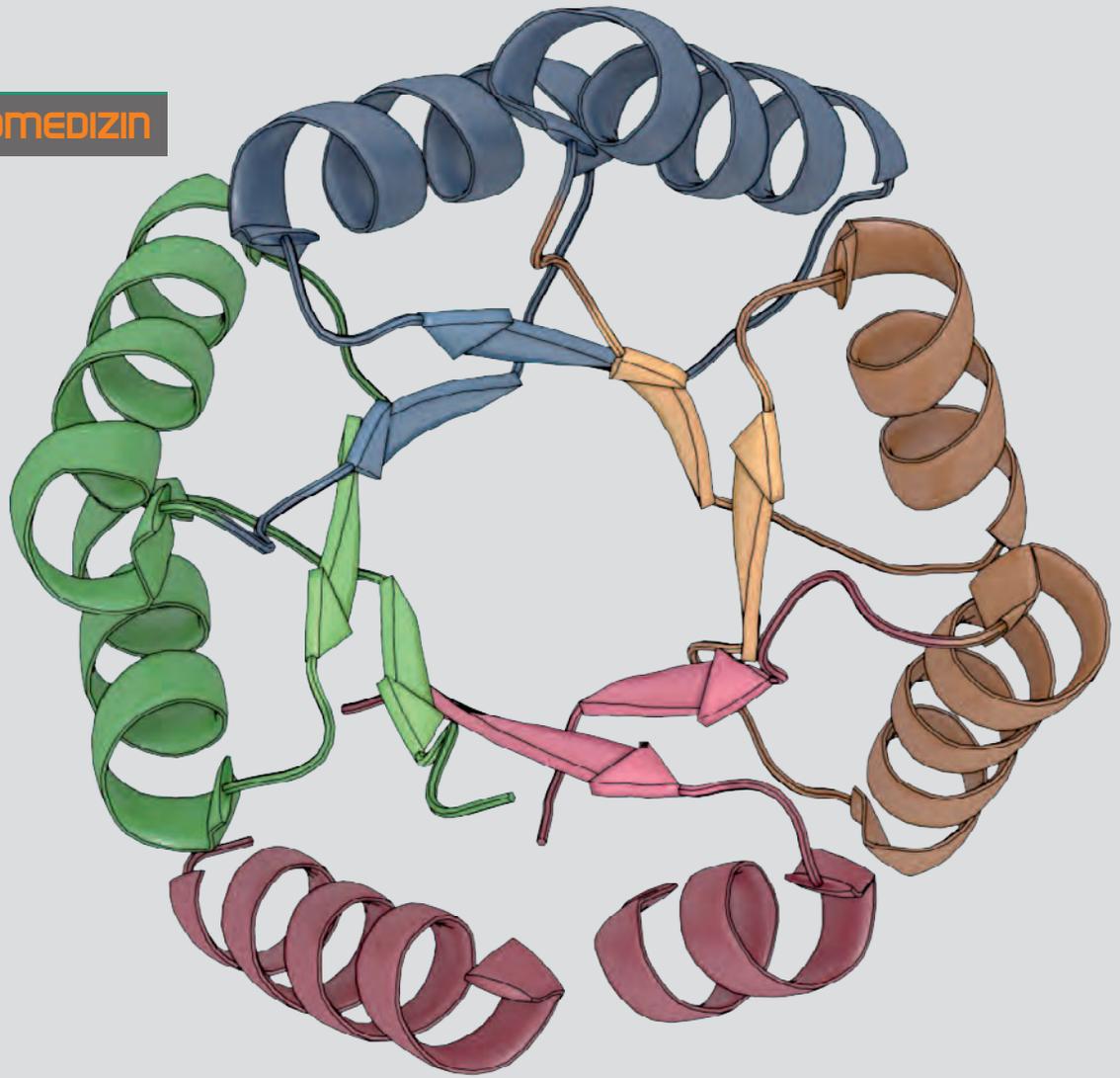
Abb. 5 (oben): Iana Kim M.Sc. bei der Datenanalyse von piRNAs aus Planarien (Foto: Christian Wißler).

Abb. 6 (links): Fluoreszenz-Experimente mit Insektenzellen (Foto: Christian Wißler).



Abb. 7: Planarium (Strudelwurm) der Art *Schmidtea mediterranea* (Foto: Alejandro Sánchez Alvarado, Wikimedia Commons, CC-BY-SA-2.5).

1 Bisherige Forschungsergebnisse sind unter anderem hier veröffentlicht: C.-D. Kuhn, RNA flexibility governs tRNA function, in: *BioEssays* (2016), Vol. 38, Issue 5, pp. 465-73, doi: 10.1002/bies.201500190. – C.-D. Kuhn et al.: On-Enzyme Refolding Permits Small RNA and tRNA Surveillance by the CCA-Adding Enzyme, in: *Cell* (2015), 60(4):644-58, doi: 10.1016/j.cell.2015.01.005. – C.-D. Kuhn and L. Joshua-Tor: Eukaryotic Argonautes come into focus, in: *Trends in Biochemical Sciences* (2013), 38(5):263-71, doi: 10.1016/j.tibs.2013.02.008. – E. Elkayam et al.: The Structure of Human Argonaute-2 in Complex with miR-20a, in: *Cell* (2012), 150(1):100-10, doi: 10.1016/j.cell.2012.05.017.



■ BIRTE HÖCKER

Maßgeschneiderte Proteine

WIE DIE BIOWISSENSCHAFTEN DEN ‚BAUKASTEN DER NATUR‘ WEITERENTWICKELN

■ Die Struktur des mit atomarer Genauigkeit von Grund auf neu zusammengesetzten vierfach symmetrischen TIM-Barrel-Proteins (Abbildung: Birte Höcker).

Der Mensch besteht zu einem Großteil aus Proteinen. Diese Eiweißmoleküle sind unverzichtbar für unser Leben: Sie halten den Stoffwechsel am Laufen, übertragen Signale, verleihen Zellen Form und Stabilität und übernehmen viele andere essentielle Aufgaben in unseren Körpern. Um diese mannigfaltigen Aufgaben verrichten zu können, besitzen Proteine komplexe dreidimensionale Strukturen. Diese sind – entsprechend den jeweiligen Funktionen der Proteine – außerordentlich vielfältig.

Die Struktur eines Proteins beruht auf seiner Zusammensetzung, genauer: aus der Abfolge (Sequenz) der darin verketteten Aminosäuren und der Form dieser Molekülkette (Polypeptidkette). Der Prozess, der diese Struktur hervorbringt, wird als Proteinfaltung bezeichnet. Es handelt sich um einen fein abgestimmten Vorgang, der sich leicht stören lässt – wie allein schon die hohe Anzahl von Krankheiten zeigt, die durch Proteinmißfaltung hervorgerufen werden. Die Gesetzmäßigkeiten zu ergründen, die der Proteinfaltung zugrunde liegen, ist daher für die Wissenschaft von großem Interesse. So will die Grundlagenforschung beispielsweise aufklären, welche Interaktionen innerhalb von Proteinen für deren Stabilität notwendig sind und welche Interaktionen mit anderen Molekülen zu bestimmten Stoffwechselprodukten führen. Diese Erkenntnisse können anschließend genutzt werden, um Strategien für die Herstellung maßgeschneiderter Proteine zu entwickeln, zum Beispiel für spezielle Aufgaben in der Biotechnologie oder der Biomedizin. Das Protein-Design ist noch eine vergleichsweise junge Forschungsrichtung in den molekularen Biowissenschaften. Es bildet den Schwerpunkt der Forschungsgruppe um Prof. Birte Höcker, die 2016 an der Universität Bayreuth ihre Arbeit aufnahm.

DREI STRATEGIEN DES PROTEIN-DESIGNS

Die meisten Ansätze des Protein-Designs verfahren so, dass sie bereits bekannte Proteine als Ausgangspunkt nehmen und deren Aminosäuresequenz verändern – mit dem Ziel, dass das veränderte Protein eine neue Funktion ausübt. Eine etablierte Strategie, die in dieser Weise verfährt, ist die "gerichtete Evolution". Hierbei werden zufällig ausgewählte Aminosäure-Veränderungen (Mutationen) jeweils in das gleiche Protein eingefügt, so dass eine große Anzahl von Varianten entsteht.

Durch geschickte Selektion oder Hochdurchsatz-Tests wird dann das Protein mit der gewünschten Funktion herausgefischt.

Ein anderer vielversprechender Ansatz ist das computergestützte Protein-Design. Hier wird eine definierte große Anzahl möglicher Mutationen theoretisch durchsucht. Dabei werden die erfolgversprechendsten Varianten identifiziert, und nur sie werden anschließend experimentell getestet. Dank moderner Computerprogramme sind derartige Verfahren immer leistungsfähiger geworden. So lassen sich heute zum Beispiel

- natürliche Proteine mit neuen Funktionen ausstatten,
- Katalysezentren in natürlichen Proteinen so verändern, dass sie neue Reaktionsprodukte herstellen,
- oder vorhandene Bindungstaschen so modifizieren, dass die umgebauten Proteine mit anderen Partnern chemische Verbindungen eingehen.

Schließlich gibt es Bestrebungen, Proteine von Grund auf neu zu bauen. Dieser Ansatz wird in der Forschung als *de novo*-Design bezeichnet. Die dafür zur Verfügung stehenden Computeralgorithmen sind in den letzten Jahren effizienter geworden, gleichwohl bleiben die Anforderungen an die Rechenleistung enorm hoch. Für ein kleines Protein bestehend aus 100 Aminosäuren gibt es bei 20 möglichen Aminosäuren bereits 20^{100} Kombinationen. Die Zahl der zu durchsuchenden Varianten erhöht sich zusätzlich dadurch, dass es unterschiedliche räumliche Strukturen (Konformationen) gibt, in die sich die Polypeptidkette falten kann. Es konnten aber unlängst generelle Design-Regeln identifiziert werden, die es ermöglichen, kleine Proteine mit guter Erfolgsrate von Grund auf neu herzustellen. Freilich handelt es sich dabei um ‚idealisierte‘ Proteine – mit wenig Schleifen und Ausschmückungen, wie sie für komplexe enzymatische Funktionen unverzichtbar sind.

AUTORIN



Prof. Dr. Birte Höcker ist Professorin für Biochemie an der Universität Bayreuth (Foto: Jörg Abendroth/MPI für Entwicklungsbiologie).



Abb. 1: Blick in ein Laborregal (Foto: Christian Wißler).

Abb. 2: Dipl.-Biol. Saacnicteh Toledo-Patino, Dr. Kaspar Feldmeier und Prof. Dr. Birte Höcker (v.l.) betrachten das neue TIM-Barrel-Protein am Bildschirm (Foto: Christian Wißler).

Auf lange Sicht werden die drei Strategien zusammenwachsen und sich gegenseitig ergänzen. Dann wird die biowissenschaftliche Forschung noch besser als heute in der Lage sein,

- neue, theoretisch mögliche Baupläne für Proteine zu identifizieren,
- besonders interessante und vielversprechende Baupläne auszuwählen
- und Proteine herzustellen, die diesen Bauplänen (fast) vollständig entsprechen.

DESIGN EINER PROTEINFALTUNG MIT ATOMARER GENAUIGKEIT

Eine Proteinfaltung, die außerordentlich häufig in natürlichen Enzymen vorkommt, ist das sogenannte TIM-barrel. Diese Protein-Architektur erscheint besonders geeignet, Stabilität und komplexe Funktionalität zu vereinen. Das *de novo*-Design dieser wichtigen Struktur war seit Jahrzehnten die erklärte Absicht von Protein-Ingenieuren. In einem Konsortium mit Wissenschaftlern aus den USA und Mexiko hat die Arbeitsgruppe um Prof. Birte Höcker dieses Ziel vor kurzem erreicht. Aufbauend auf geometrischen und chemischen Prinzipien ist es gelungen, ein TIM-Barrel mit einer Länge von 184 Aminosäuren von Grund auf neu zu bauen (Abb. 2). Es ist stabil gegenüber Hitze, und seine Struktur ist nahezu identisch mit dem Design-Modell.¹ Auffällig ist: Die Aminosäuresequenz dieses synthetischen TIM-Barrel-Proteins hebt sich deutlich ab von den Sequenzen natürlicher TIM-Barrel-Proteine. So zeigt sich an diesem Forschungserfolg, dass die Natur nicht alle denkbaren TIM-Barrel-Sequenzen ausprobiert hat.

„WOMÖGLICH LASSEN SICH SCHON BALD PROTEINFRAGMENTE MIT BEKANNTEN STRUKTUREN UND FÄHIGKEITEN NACH WUNSCH ZUSAMMENSETZEN.“

Das neue TIM-Barrel-Protein stellt einen spannenden Ausgangspunkt für das Design völlig neuer Enzyme dar. Hierbei geht es langfristig darum, Enzyme mit maßgeschneiderten Bindungstaschen auszustatten, kleine Moleküle darin zu platzieren und somit chemische Reaktionen zu beschleunigen. Trotz der großen Fortschritte bedarf es dazu noch weiterer Methodenentwicklung, vor allem auch um die Vorhersagekraft der Programme ro-



buster zu machen. Und so wird auch weiterhin an neuen Strategien für das Design komplexer Proteine gearbeitet.

DER BAUKASTEN DER NATUR

Die Bayreuther Arbeitsgruppe um Prof. Birte Höcker lässt sich bei ihren Design-Ansätzen von den Mechanismen der Natur inspirieren. Die Natur hat ein Repertoire von Proteinen hervorgebracht, die eine beeindruckende Vielzahl von Funktionen ausüben. Bei näherem Hinschauen fällt auf, dass die verschiedenen Proteine aus den gleichen Bausteinen aufgebaut sind: Dazu zählen zunächst einmal die Domänen. Dies sind größere molekulare Einheiten, die innerhalb einer Polypeptidkette in verschiedenen Variationen vorkommen können. Darüber hinaus gibt es kleinere Fragmente, die sich durch Mechanismen wie Duplikationen und Rekombinationen zu verschiedensten komplexen Proteinen entwickelt haben.² Solche Fragmente können durch spezielle Algorithmen identifiziert werden und stellen interessante Bausteine für das Protein-Design dar.

Diese neue Design-Strategie wird in Bayreuth im Rahmen des Projekts „Protein-Lego“ entwickelt, das der Europäische Forschungsrat (ERC) mit einem *Consolidator Grant* fördert. Mit diesem begehrten Preis werden Nachwuchswissenschaftler ausgezeichnet, die herausragende Forschungsarbeiten leisten.



EIN WERKZEUG DER ZUKUNFT

Das Design von Proteinen hat in den letzten Jahren enorme Fortschritte gemacht, insbesondere durch die Entwicklung computergestützter Methoden. Es handelt sich zunächst einmal um eine Technik der Grundlagenforschung. Die bisherigen Forschungsarbeiten haben gezeigt, dass die entwickelten Strategien grundsätzlich funktionieren. Dies zeigt sich nicht zuletzt darin, dass es im Rahmen der beschriebenen Forschungsarbeiten gelungen ist, eine Handvoll maßgeschneiderter Proteine herzustellen, die durch eine hohe Stabilität gekennzeichnet sind. Vor diesem Hintergrund zeichnen sich hochinteressante Anwendungsperspektiven ab, wie etwa die gezielte Erhöhung der Stabilität von Enzymen. Auch scheint es künftig möglich, die katalytische Effizienz von Enzymen zu steigern. Eine weitere spannende Perspektive ist die Entwicklung neuer Bindeproteine, die in der Biomedizin anstelle von Antikörpern eingesetzt werden können. Darüber hinaus werden sich Biosensoren entwickeln lassen, die kleine Moleküle in zellulären Prozessen für die Biotechnologie oder die Biomedizin sichtbar machen.

Ganz so passend wie Lego-Bausteine sind die Protein-Fragmente allerdings nicht. Oft müssen Anpassungen an deren Grenzflächen vorgenommen werden, um die Interaktionen zwischen den Bausteinen zu optimieren.³ In jedem Fall aber birgt dieser Baukasten-Ansatz einen bedeutenden Vorteil gegenüber anderen Design-Strategien: Er nutzt interessante Eigenschaften, die einige Bausteine bereits mitbringen – zum Beispiel Interaktionen mit anderen Materialien oder die Bindung von Molekülen oder Molekülgruppen, die für spezielle Funktionen von Enzymen unentbehrlich sind. So hat diese Methode das Potenzial, recht schnell neue funktionale Proteine durch die Kombination entsprechender Fragmente zu erreichen (Abb. 3). Womöglich lassen sich also schon bald Proteinfragmente mit bekannten Strukturen und Fähigkeiten nach Wunsch zusammensetzen – mit dem Ergebnis, dass neue Enzyme, Wirkstoffe oder andere funktionelle Einheiten entstehen.

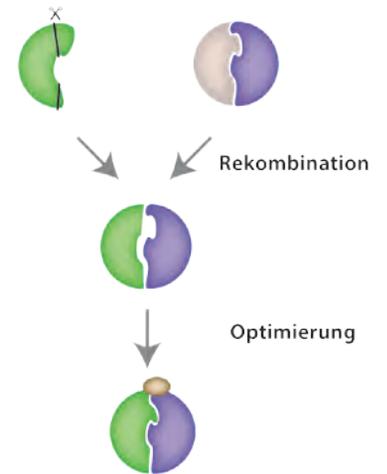


Abb. 3: Die Kombination von Fragmentbausteinen ermöglicht das Design von Proteinen mit neuen Funktionen (Grafik: Birte Höcker).

Abb. 4 (links): Reinigungsapparatur für Proteine im Kühlraum. (Fotos: Christian Wißler).

Abb. 5 (rechts): Sooruban Shanmugaratnam, TA, an einer Zentrifuge zur Trennung von Proteinen (Foto: Christian Wißler).

- 1 P.-S. Huang et al.: *De novo* design of a four-fold symmetric TIM-barrel protein with atomic-level accuracy, in: *Nature Chemical Biology* (2015) 12(1), pp. 29–34, doi: 10.1038/nchembio.1966.
- 2 J. A. Farias-Rico et al.: Evolutionary relationship of two ancient superfolds, in: *Nature Chemical Biology* (2014), 10(9), pp. 710–715, doi: 10.1038/nchembio.1579.
- 3 Hierbei kommen die bereits skizzierten computergestützten Verfahren zur Anwendung: S. Eisenbeis et al.: The potential of fragment recombination for the rational design of proteins, in: *Journal of the American Chemical Society* (202), 134(9), pp. 4019–4022, doi: 10.1021/ja211657k.



■ FRANK HAHN
TIM HOLLMANN
JOHANNES WUNDERLICH

Vom Naturstoff zum Wirkstoff

WIE DIE BIOSYNTHESEFORSCHUNG
NEUE ANSÄTZE IN DER BIOMEDIZIN UND DER BIOTECHNOLOGIE FÖRDERT

■ Doktorand Marius Schröder M.Sc. bei der Naturstoff-
synthese im Chemischen Labor (Foto: Christian Wißler).

Das Potenzial von Naturstoffen im therapeutischen Bereich ist dem Menschen seit Langem bekannt und wird von jeher intensiv genutzt. Dabei profitiert man davon, dass diese Substanzen per se biologisch aktiv sind; denn die Organismen, die sie produzieren, sichern sich dadurch einen Überlebensvorteil. Insbesondere Pflanzen, Bakterien und Pilze nutzen Naturstoffe für so unterschiedliche Aufgaben wie die chemische Verteidigung gegen Konkurrenten oder die Kommunikation mit anderen Organismen in ihrer nahen Umgebung.

Im natürlichen Kontext ändern Naturstoffe ihre Eigenschaften entsprechend ihrer biologischen Funktion in einem andauernden evolutionären Prozess. Diese Anpassung drückt sich in Veränderungen ihrer Strukturen aus. Der Mensch hat die Möglichkeit, diesen Prozess durch sogenannte SAR-Studien (*Structure Activity Relationship Studies*) nachzuvollziehen, ihn jedoch gerichteter und deutlich schneller zu gestalten. Dazu werden gezielt strukturelle Veränderungen eingeführt und deren Effekte in biologischen Tests untersucht. Wenn es darum geht, auf der Grundlage dieser Erkenntnisse neue Wirkstoffe für die effiziente und zugleich schonende Behandlung von Krankheiten zu finden, spielen Naturstoff-Derivate eine zentrale Rolle. Dies sind chemische Verbindungen, die hinsichtlich ihrer Strukturen mit Naturstoffen größtenteils, aber nicht vollständig identisch sind. Die Herstellung solcher Derivate ist heute eine der größten Herausforderungen im Bereich der Wirkstofffindung.

ZUGÄNGE ZU NATURSTOFFEN UND NATURSTOFF-DERIVATEN

Traditionell hat man Naturstoffe dadurch gewonnen, dass sie aus ihren Produzentenorganismen extrahiert wurden. Lässt sich der jeweilige Organismus unter Laborbedingungen kultivieren, erhält man in vielen Fällen eine größere „Ausbeute“ der zu isolierenden Verbindung. Derivate sind auf diesem Weg aber nicht direkt zu gewinnen.



Europäische Eibe
(*Taxus baccata*)

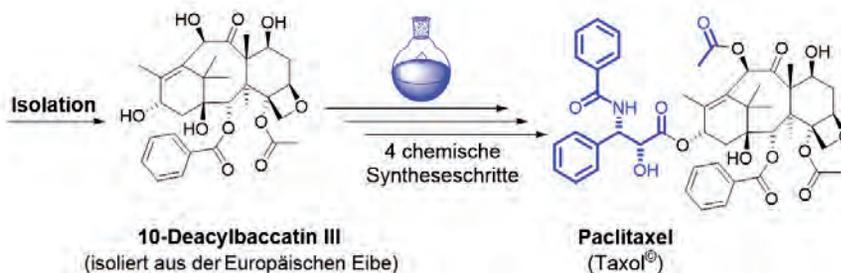


Abb. 2: Aus der Europäischen Eibe wird ein Naturstoff extrahiert, der anschließend in einem mehrstufigen Synthese-Prozess in das Chemotherapeutikum Taxol® überführt wird (Grafik: Frank Hahn).

Zugleich wurden in den letzten 150 Jahren Verfahren stetig weiterentwickelt, die darauf abzielen, Naturstoffe aus einfachen Bausteinen vollständig im Labor zu erzeugen. In der Forschung spricht man hier von einer chemischen Totalsynthese. Heutzutage ist es prinzipiell möglich, auf diesem Weg jedes gewünschte Derivat herzustellen. Allerdings ist damit oft ein hoher Ressourcenverbrauch verbunden. Daher ist es ein wichtiges Ziel der aktuellen Syntheseforschung, die Zielgenauigkeit und auch die Effizienz ihrer Verfahren weiter zu verbessern.

Darüber hinaus gibt es kombinierte Ansätze, welche die Vorteile der Naturstoff-Extraktion aus Organismen und der chemischen Totalsynthese vereinen. Besonders erwähnenswert ist hier die Semisynthese. Dabei werden Naturstoffe oder Naturstoff-Fragmente aus einem Organismus isoliert und anschließend chemisch modifiziert. Auf diesem Weg wird beispielsweise das Chemotherapeutikum Paclitaxel (Taxol®) gewonnen, das zur Behandlung von Krebserkrankungen eingesetzt wird (Abb.2).

NATURSTOFF-BIOSYNTHESE UND WEISSE BIOTECHNOLOGIE

In den vergangenen Jahren hat sich das Verständnis der Biosynthese – also der Stoffwechselwege, die zur Bildung von Naturstoffen führen – enorm verbessert. Heute weiß man, dass die Produzentenorganismen den Bauplan der von ihnen gebildeten Naturstoffe in ihren Genen tragen. Diese Information wird durch Transkription und Translation

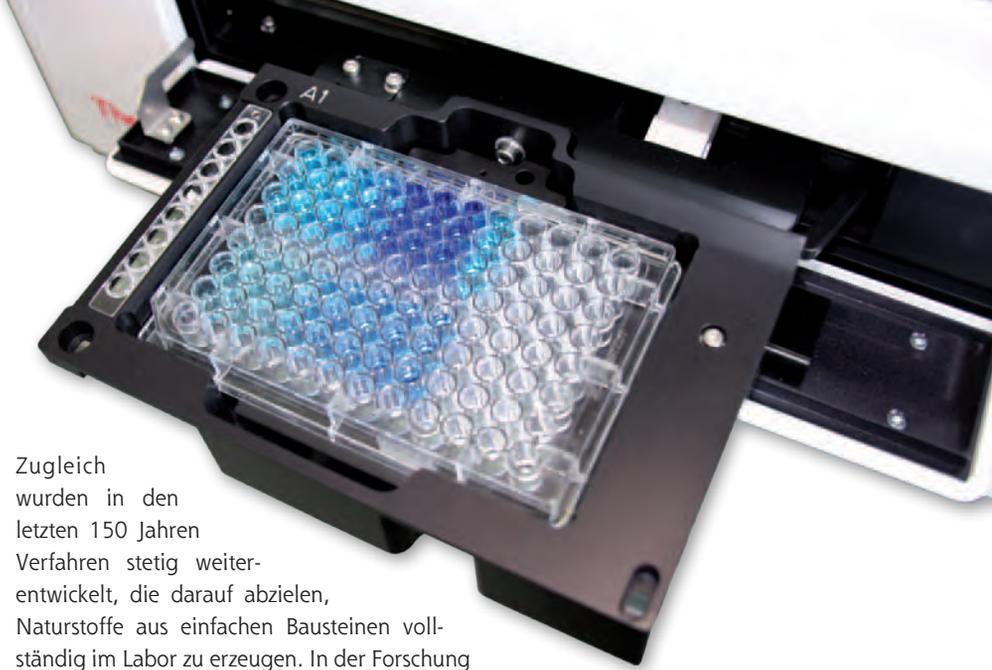
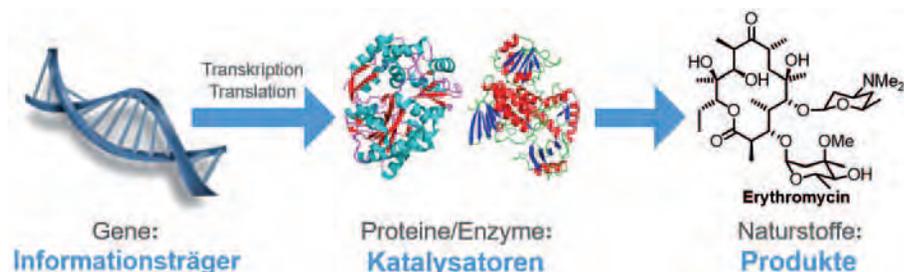


Abb. 1: Auswertung eines Enzym-Experiments mit einem Mikroplattenleser (Foto: Christian Weißler).

„INDUSTRIEKOOPERATIONEN
KÖNNEN EINE WICHTIGE
BRÜCKENFUNKTION
ZWISCHEN UNIVERSITÄRER
GRUNDLAGEN- UND
ANGEWANDTER FORSCHUNG
ÜBERNEHMEN.“

Abb. 3: Die Gene enthalten die Baupläne für die im Organismus produzierten Proteine, insbesondere für Enzyme, die als Katalysatoren eine Vielzahl von Stoffwechselprozessen steuern. Hierzu zählt auch die Herstellung von Naturstoffen. Das Wissen über diese Zusammenhänge erleichtert es, neue Derivate für Wirkstofftests herzustellen (Grafik: Frank Hahn).



in (enzymatisch aktive) Proteine überführt. Dies sind die eigentlichen Akteure beim Aufbau der Naturstoffe. Sie sind in der Lage, innerhalb der Zelle zielgenau die jeweils benötigten Bausteine auszuwählen und schrittweise zu den komplexen Naturstoff-Molekülen zusammenzusetzen (Abb. 3).

lel dazu auch deren Biosynthese in Organismen. Das dabei gewonnene Wissen wird genutzt, um Naturstoff-Derivate zu entwickeln und so die Findung effektiver biomedizinischer Wirkstoffe zu unterstützen.¹ Ebenso tragen die neuen Erkenntnisse dazu bei, biotechnologische Produktionsprozesse zu entwickeln, die nachhaltiger sind als rein chemische Verfahren. Zwei konkrete Beispiele sollen im folgenden einen Einblick in diese Bayreuther Forschungswerkstatt bieten.

STUDIEN ZUR BIOSYNTHESE DES BORRELIDINS

Borrelidin ist ein Naturstoff, der von verschiedenen Arten der Bakteriengattung *Streptomyces* gebildet wird und außergewöhnlich vielfältige biologische Aktivitäten aufweist. Daher könnten Borrelidin-Derivate in Zukunft als Wirkstoffe gegen eine Vielzahl von Krankheiten eingesetzt werden. Möglich wäre beispielsweise eine Nutzung als Antibiotikum, als antivirales Medikament oder auch in der Chemotherapie von Tumorerkrankungen.

Um das Wirkungspotenzial des Borrelidins voll ausschöpfen zu können, wurde dessen Biosynthese in einer interdisziplinären Zusammenarbeit mehrerer Forschungsgruppen aufgeklärt. Das Bayreuther Team zeigte, wie die Z-konfigurierte Doppelbindung (Abb. 5) in das Molekül eingebaut wird. Zunächst wird die Doppelbindung durch das Enzym BorDH3 in einer inaktiven Form (E-konfiguriert). Durch eine Umwandlung in die aktive Form (Z-konfiguriert) gegen Ende der Biosynthese wird die biologische Aktivität der Verbindung ‚angeschaltet‘.² Dieses Wissen hilft dabei, den Wirkmechanismus des Borrelidins besser zu verstehen und neue Derivate herzustellen.

Die Forschungsarbeiten wurden in Zusammenarbeit mit der Firma Biotica (jetzt: Isomerase Therapeutics Ltd.) durchgeführt. Diese nutzt die gewonnenen Erkenntnisse, um Wirkstoffkandidaten weiterzuentwickeln und in klinische Tests zu bringen. Hierbei handelt es sich um unentbehrliche Schritte auf dem Weg zur Entwicklung neuer Medikamente – ein Beispiel dafür, dass Industrie-

Aufbauend auf dem Wissen über diese Zusammenhänge, kann man heute die Biosynthese von Naturstoffen gezielt verändern. Zudem ist es möglich, Teile dieser ‚Maschinerie‘ außerhalb des natürlichen Kontextes zu nutzen. Solche biotechnologischen Ansätze gewinnen stark an Bedeutung und bilden ein Teilgebiet der Biokatalyse, auch ‚Weiße Biotechnologie‘ genannt. Diese beschäftigt sich allgemein mit der Entwicklung von nachhaltigen, biobasierten Prozessen zur Herstellung von Chemikalien, Biomolekülen und Materialien. Die industriellen Anwendungen sind äußerst vielfältig: Sie umfassen beispielsweise die Veredelung von Lebensmitteln, den Einsatz von Enzymen als Waschmittelzusätze oder Katalysatoren in der organischen Synthesechemie.

AUF DEM WEG ZU NEUEN NATURSTOFF-DERIVATEN

Die deutlichen Fortschritte auf dem Gebiet der Biosyntheseforschung haben zahlreiche innovative Ansätze zur Herstellung von Naturstoff-Derivaten ermöglicht. Exemplarisch seien hier die *Kombinatorische Biosynthese* und die *Chemoenzymatische Synthese* genannt. An der Universität Bayreuth befasst sich die Arbeitsgruppe von Prof. Frank Hahn nicht allein mit der chemischen Synthese von Naturstoffen im Labor, sondern untersucht paral-



Abb. 4: Züchtung von Mikroorganismen. Re.: Prof. Frank Hahn (Foto: Ch. Wißler).

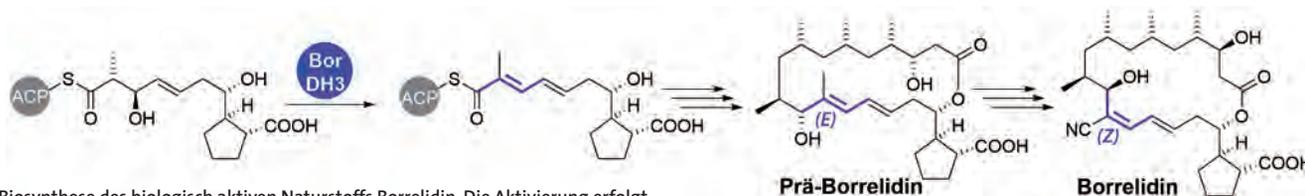


Abb. 5: Biosynthese des biologisch aktiven Naturstoffs Borrelidin. Die Aktivierung erfolgt gleichsam durch einen ‚Schalter‘: Die mithilfe des Enzyms BorDH3 entstandene Doppelbindung (blau) wird aus einer inaktiven Form (E) in die aktive Form (Z) überführt (Grafik: Frank Hahn).



Abb. 6: Entfernung organischer Lösungsmittel (Foto: Christian Wißler).

kooperationen eine wichtige Brückenfunktion zwischen universitärer Grundlagen- und angewandter Forschung übernehmen können.

DIE AMBRUTICIN-BIOSYNTHESE – EINE QUELLE NEUER BIOKATALYSATOREN

Immer häufiger verlieren antibiotische Medikamente ihre Wirksamkeit, weil die Mikroorganismen, gegen die sie sich richten, Resistenzen ausbilden. Die Forschung ist daher ständig herausgefordert, die entstandenen Lücken durch Neuentwicklungen zu schließen. Daher sind neue Wirkstoff-Kandidaten hoch willkommen. Dies gilt insbesondere für antimykotische Wirkstoffe, die sich zur Bekämpfung von Pilzinfektionen eignen (mykes: griechisch für Pilz). Sie sind erheblich schwieriger zu entwickeln als antibakterielle Wirkstoffe, und somit ist die Zahl verfügbarer Wirkstoffe deutlich geringer. Als besonders vielversprechende Naturstoffe gelten heute die von Myxobakterien gebildeten Ambruticine. Sie wirken stark antimykotisch und zeichnen sich gleichzeitig durch eine sehr geringe Toxizität (Giftigkeit) für den Menschen aus. Somit sinkt das Risiko, dass ihr Einsatz gegen Pilzkrankheiten zu unerwünschten Nebenwirkungen führen könnte. Daher besteht seitens des Pflanzenschutzes und der Medizin ein starkes Interesse an Derivaten dieses Naturstoffs.



Die molekulare Struktur der Ambruticine ist ungewöhnlich komplex, so dass Derivate mit traditionellen Methoden nur schwierig herzustellen sind. Die Bayreuther Forschungsgruppe entwickelt derzeit ein neuartiges Verfahren, das die Herstellung stark vereinfacht. Eine Untersuchung der Ambruticin-Biosynthese ergab nämlich, dass daran Enzyme beteiligt sind, die als Biokatalysator genutzt werden können.³ Diese Enzyme lassen sich biotechnologisch herstellen und in verbesserten Herstellungsverfahren einsetzen. Auf diesem Weg werden Ambruticin-Derivate nun für biologische Tests zugänglich, ihr Wirkstoffpotenzial wird insgesamt besser ausgeschöpft.

Darüber hinaus bieten sich weitere Anwendungsmöglichkeiten (Abb. 7). Denn einige der in Bayreuth analysierten Enzyme eignen sich auch für die Synthese anderer Naturstoffe, die gleichfalls ein vielversprechendes Wirkstoffpotenzial zeigen. Zudem könnten sie in nachhaltigen Verfahren eingesetzt werden, die der Synthese von Feinchemikalien dienen.

ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Naturstoffe und ihre Derivate sind aus Sicht der Wirkstoffforschung hochattraktive Kandidaten. Die Erschließung ihres Potenzials wird allerdings häufig durch deren hohe strukturelle Komplexität erschwert. Neuartige Ansätze zu entwickeln, die diese Hürden überwinden helfen, ist auch in Zukunft ein vorrangiges Ziel von Bayreuther Forschungsgruppen im Bereich der Organischen Chemie. Die Forschungsergebnisse können dazu beitragen, eine größere Anzahl von Wirkstoffkandidaten zugänglich zu machen und deren Herstellung deutlich effizienter zu gestalten. Auf diese Weise werden sie auch die Entwicklung einer nachhaltigeren Bioökonomie fördern.

- 1 F. Hemmerling, F. Hahn: Neue Wege in der Naturstoffforschung: Die erfolgreiche Verbindung von Synthesechemie und Biotechnologie, in: GIT-Labor-Fachzeitschrift (2014), 5, S. 48-51.
- 2 N. Kandziora et al.: Uncovering the origin of Z-configured double bonds in polyketides: intermediate E-double bond formation during borrelidin biosynthesis, in: Chemical Science (2014), Issue 5, pp. 3563-3567.
- 3 G. Berkhan, F. Hahn: A Dehydratase Domain in Ambruticin Biosynthesis Displays Additional Activity as a Pyran-Forming Cyclase, in: Angewandte Chemie International Edition (2014), Issue 53, pp. 14240-14244, doi: 10.1002/anie.201407979.

Abb. 7: Das Enzym AmbDH₃ aus der Ambruticin-Biosynthese könnte breite Anwendung in der Synthesetechnologie finden. Es lassen sich viele verschiedene molekulare Ringe herstellen (Grafik: Frank Hahn).

AUTOREN



Prof. Dr. Frank Hahn ist Professor für Organische Chemie (Lebensmittelchemie) an der Universität Bayreuth.



Tim Hollmann M.Sc. und Johannes Wunderlich M.Sc. sind Doktoranden und wissenschaftliche Mitarbeiter im Team von Prof. Dr. Frank Hahn.

BIOMEDIZIN

■ RAINER SCHOBERT
MATTHIAS ROTHMUND
FLORIAN SCHMITT

Auf dem Weg zu neuen Krebstherapien

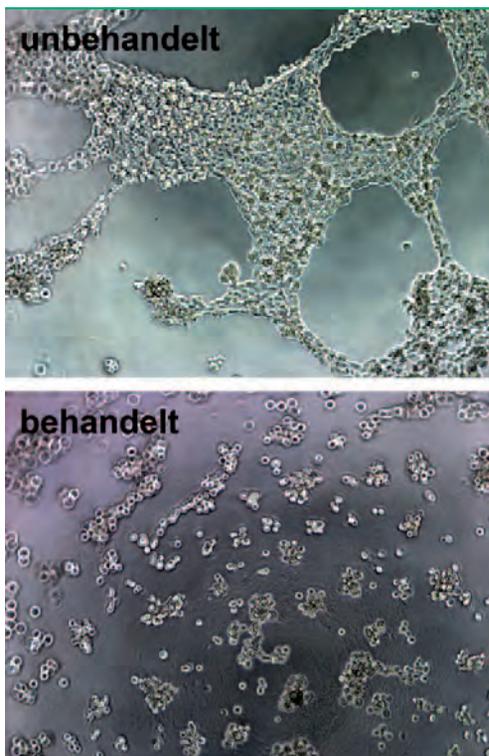
NEUARTIGE WIRKSTOFFE
LASSEN TUMORE VERHUNGERN
UND ERSTICKEN

■ Erste Betrachtungen von Fluoreszenzfärbungen am laboreigenen Fluoreszenzmikroskop (Foto: Christian Wißler).

In Deutschland zählt Krebs nach Herz und Kreislauferkrankungen noch immer zu den häufigsten Todesursachen mit jährlich rund 500.000 Neuerkrankungen und 224.000 Todesfällen.¹ Krebs ist die Folge zellulärer Fehlregulationen, hervorgerufen durch zufällige Mutationen in der DNA. Meist erkennt das körpereigene Immunsystem deregulierte Zellen frühzeitig und beseitigt sie. Auch haben die Zellen Schutzmechanismen, die in solchen Fällen zum programmierten Zelltod (Apoptose) führen. Manchmal aber entgehen Krebszellen beiden Wächtern und vermehren sich unkontrolliert weiter.

DEM TUMOR DEN SAFT ABDREHEN

Tumore ab einer Größe von etwa 2 mm³ benötigen eigene Blutgefäße, um ihren stark erhöhten Nähr- und Sauerstoffbedarf zu decken. Eine erfolgversprechende Strategie der Tumorbehandlung ist es, diese Versorgung des Tumors durch Blutgefäße (Vaskularisierung) zu hemmen. Die molekularen Mechanismen, die zur Neubildung von Blutgefäßen (Angiogenese) führen, sind heutzutage gut bekannt; ebenso die Unterschiede zwischen gesunden und tumoralen Blutgefäßen sowie die Moleküle, an denen medizinische Wirkstoffe ansetzen können (Targets). Dies erlaubt die Entwicklung von



Wirkstoffen, die speziell den Tumor treffen und den Gesamtorganismus weit weniger schädigen als die früher alternativlosen Zytostatika. Dabei unterscheidet man zwischen antiangiogenen und vaskular-disruptiven Wirkstoffen.

NEUE BLUTGEFÄSSE VERHINDERN

Während der Tumor wächst, regen Tumorzellen Blutgefäße im umliegenden Gewebe zur Zellteilung an. Sie tun dies durch spezielle Wachstumsfaktoren, die VEGFs (Vascular Endothelial Growth Factors), die vor allem das Wachstum der an den Gefäß-Innenwänden befindlichen Endothelzellen fördern. Antiangiogene Wirkstoffe greifen bereits in diese Prozesse des Gefäßwachstums ein. Sie verhindern die Ausbildung neuer Blutgefäße im Tumor – sei es, dass sie die Produktion der Wachstumsfaktoren hemmen; sei es, dass sie die entsprechenden VEGF-Rezeptoren blockieren. Da die Neubildung gesunder Blutgefäße im erwachsenen Menschen nur noch eine unbedeutende Rolle spielt, wirken derartige Wirkstoffe spezifisch auf den Tumor. Im Labor stehen für ihre Untersuchung einfache Tests (Assays) zur Verfügung. Im Tubeformation-Assay werden Wirkstoffe daraufhin getestet, wie sie die Ausbildung kapillarer, röhrenförmiger Strukturen aus Endothelzellen beeinflussen. Diese sind den tumoralen Blutgefäßen sehr ähnlich und eignen sich somit als Modellsystem (Abb. 1).

BESTEHENDE BLUTGEFÄSSE ZERSTÖREN

Vaskular-disruptive Wirkstoffe (VDA) richten sich gegen die bereits bestehenden Blutgefäße eines Tumors. Dabei machen sie sich die morphologischen Unterschiede zwischen normalen gesunden Blutgefäßen und den schnell und „schlampig“ verlegten Blutgefäßen im Tumor zunutze. Letztere sind meist stark durchlässig („leck“) und für die Blutströmung nicht optimal. VDAs destabilisieren diese Blutgefäße weiter, indem sie das Grundgerüst (Zytoske-

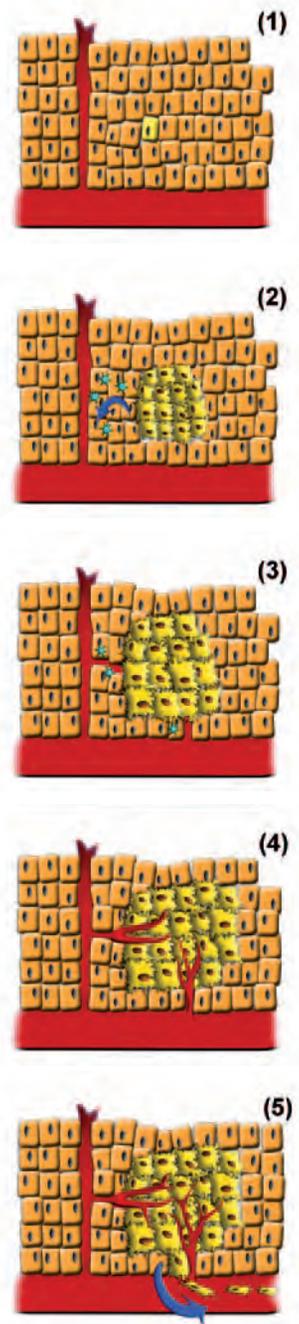


Abb. 1 (links): Antiangiogene Wirkstoffe verhindern die Neubildung von Blutgefäßen, indem sie die Ausbildung kapillarer Strukturen aus Endothelzellen hemmen (Mikroskopische Aufnahmen: Florian Schmitt).

Abb. 2 (rechts): Entstehung, Wachstum und Metastasierung eines Tumors. Tumore entstehen häufig aus einer einzelnen deregulierten Zelle (1). Unkontrolliertes Wachstum führt zur Unterversorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen. Der Mikrotumor regt durch Wachstumsfaktoren nahegelegene Blutgefäße zur Sprossung an (2). Durch das Ausbilden eines neuen Blutgefäßsystems wird der Tumor versorgt (3,4). Einzelne Zellen können sich vom Primärtumor ablösen, durch das Gefäßsystem wandern und in das Blutgefäßsystem des Körpers gelangen (5) (Grafik: Matthias Rothemund).

Abb. 3: Der Naturstoff Combretastatin A-4 und daraus abgeleitete vaskular-disruptive Wirkstoffe binden an das Protein Tubulin. So verhindern sie die Ausbildung eines komplexen Zytoskeletts (unbehandelt) und destabilisieren so diese Zellen (behandelt) (Mikroskopische Aufnahme: Florian Schmitt).

AUTOREN

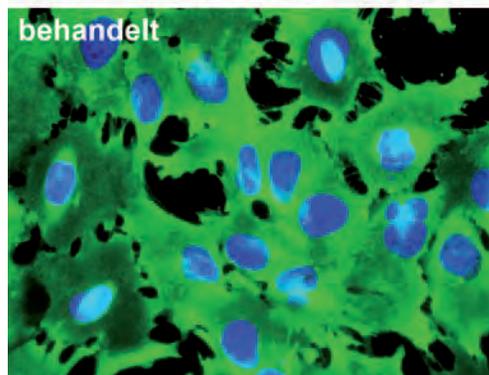
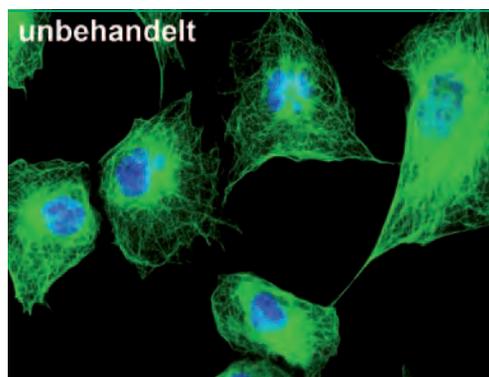


Prof. Dr. Rainer Schobert ist Inhaber des Lehrstuhls Organische Chemie I an der Universität Bayreuth.



Matthias Rothmund M.Sc. und Florian Schmitt M.Sc. sind Doktoranden am Lehrstuhl Organische Chemie I.

lett) der Endothelzellen sowie deren Verbindungen untereinander zerstören. Letztlich kollabieren die tumoralen Blutgefäße unter dem Druck des Tumors, und die Blutversorgung wird unterbrochen. Auf diese Weise wird jedoch nur der sauerstoffarme Kern des Tumors angegriffen. Die Tumorrinde hingegen versorgt sich weiter über das umliegende Gewebe mit den nötigen Stoffen. Daher müssen vaskular-disruptive Wirkstoffe in Kombination mit anderen Wirkstoffen verabreicht werden.



NATURSTOFFE: AUSGANGSPUNKT FÜR NEUE ANTITUMORALE WIRKSTOFFE

Der Lehrstuhl Organische Chemie I der Universität Bayreuth befasst sich schon seit einigen Jahren mit antitumoralen Wirkstoffen. Diese Forschungsarbeiten sind Teil eines breiten Spektrums interdisziplinärer Forschungsinteressen. Diese reichen von der Synthese komplizierter organischer Moleküle, für die neue Verfahren und Reagentien entwickelt werden, bis hin zur Entwicklung effizienter pharmazeutischer Wirkstoffe. Daher arbeiten Syntheschemiker und Biochemiker am Lehrstuhl eng zusammen. Ein Schwerpunkt ist dabei die Entwicklung neuer, von Naturstoffen abgeleiteter Wirkstoffe, die sich zur effektiven und zugleich schonenden Behandlung von Krebserkrankungen eignen.

„BESONDERS ERFOLGVERSPRECHENDE WIRKSTOFFKANDIDATEN WERDEN AN AUSGEWÄHLTEN *IN-VIVO*-SYSTEMEN UNTERSUCHT.“

Ausgangspunkt dieser Forschungsarbeiten sind in der Natur vorkommende Stoffe, die von sich aus eine antitumorale Wirkung haben, deren Aktivität, Zielgenauigkeit und Verträglichkeit aber durch gezielte chemische Modifikationen erhöht wird. Ein Beispiel ist das Combretastatin A-4 (CA4), ein Naturstoff, der in der Rinde der afrikanischen Buschweide *combretum caffrum* enthalten ist. CA4 greift das Protein Tubulin an, das wichtige Stützfunktionen für die Endothelzellen in den Blutgefäßen hat und auch für die Zellteilung unentbehrlich ist. Indem CA4 die Polymerisation von Tubulin hemmt, kommt es zum Kollabieren der Blutgefäße und folglich zu Gefäßverschlüssen im Tumor. Ein rasches Absterben des Tumors ist die Folge (Abb. 3). Allerdings hat CA4 einige Schwächen, wie beispielsweise eine geringe Bioverfügbarkeit, Instabilität und Nebenwirkungen.

Der Forschungsgruppe um Prof. Rainer Schobert ist es jedoch gelungen, durch chemische Modifikationen dieses Naturstoffs neue vielversprechende Wirkstoffe zu entwickeln.² Diese haben nicht die Nebenwirkungen von CA4, greifen aber die Blutgefäße des Tumors mit einer erhöhten Wirksamkeit und Zielgenauigkeit an (Abb. 4). Weitere Effekte lassen sich erzielen, indem man verschiedene *Pharmakophore* – dies sind Molekülbausteine, die eine bestimmte biologische Wirkung haben – miteinander kombiniert. Auf diese Weise wurden in Bayreuth hochaktive Verbindungen wie Etacrox entwickelt, die sich durch neue antitumorale Eigenschaften auszeichnen.³



Abb. 4: Naturstoff Combretastatin A-4 und davon abgeleitete, optimierte Wirkstoffe.

EIN ZELLBIOLOGISCHES LABOR IN DER ORGANISCHEN CHEMIE

Wie diese Beispiele zeigen, ist eine genaue Erforschung der Wirkmechanismen und Eigenschaften für jeden neuen Wirkstoffkandidaten notwendig. Dafür steht in Bayreuth ein eigenes zellbiologisches Labor im Bereich der Organischen Chemie I zur Verfügung. Eine große Bibliothek humaner Tumorzelllinien bietet bereits im frühen chemischen Entwicklungsstadium die Möglichkeit, das therapeutische Potenzial neu entdeckter Wirkstoffe, aber auch mögliche giftige Nebenwirkungen abzuschätzen. Um die genauen Wirkmechanismen ermitteln zu können, wurden in diesem Labor zellbiologische und immunologische Testsysteme etabliert – zum Beispiel der schon genannte *Tubeformation-Assay*, mit dem die antiangiogene bzw. vaskular-disruptive Aktivität von Wirkstoffen bestimmt werden kann.



Abb. 5: Doktorand Matthias Rothemund M.Sc. bei Untersuchungen an einer Zellkultur unter sterilen Bedingungen in einer Vertikalstromwerkbank. (Foto: Christian Wißler).

IN-VIVO-TESTS OHNE TIERVERSUCHE

Die Ergebnisse aus solchen *In-vitro*-Tests erlauben allerdings nur sehr bedingt Rückschlüsse auf die Wirkung in Tieren oder gar im Menschen. Die Bayreuther Forschungsgruppe führt generell keine Versuche an Tieren im Sinne des Tierschutzgesetzes durch. Besonders erfolgversprechende Wirkstoffkandidaten werden jedoch an ausgewählten *In-vivo*-Systemen untersucht. So lässt sich unter dem Mikroskop deutlich beobachten, wie sich in einem Zebrafischembryo neue Blutgefäße bilden und wie diese Angiogenese durch Wirkstoffe gehemmt wird (Abb. 6). Im Hühnerei hingegen kann man

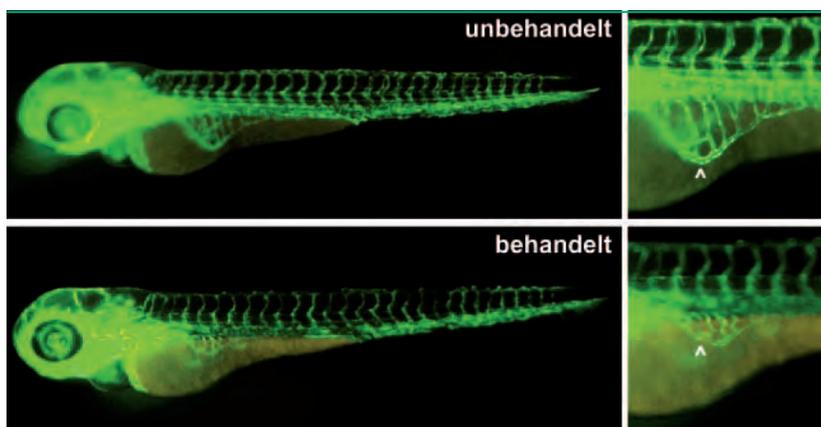


Abb. 6: Antiangiogene Wirkstoffe verhindern die korrekte Ausbildung der subintestinalen Venen (mit Pfeilen gekennzeichnet) in Zebrafischembryonen (Mikroskopische Aufnahmen: Florian Schmitt).

besonders gut die vaskular-disruptive Wirkung von Wirkstoffen feststellen. Diese werden – durch ausgeschnittene Löcher in der Schale – auf die *Chorioallantoismembran* (CAM) befruchteter Hühnereier aufgebracht. Diese Membran ist das Hühneräquivalent zur menschlichen Plazenta. Sie ist von zahlreichen Blutgefäßen durchzogen und sorgt für den Gasaustausch mit der Umgebung (Abb. 7).

DAS ZIEL: NEUE WIRKSTOFFE ZUR VERHINDERUNG VON METASTASEN

Der Bedarf an neuen, selektiveren, schonenderen und insbesondere auf den einzelnen Patienten abgestimmten Krebstherapeutika ist unverändert hoch. Von großem Interesse sind Wirkstoffe, die an Krebs erkrankten Patienten verabreicht werden können, um zukünftige Tumormetastasen zu unterdrücken. Um entsprechende Wirkstoff-Kandidaten zuverlässig testen zu können, arbeitet der Lehrstuhl Organische Chemie I gemeinsam mit der SIMFO GmbH und dem Transfusionslabor Dr. Pachmann in Bayreuth an der Entwicklung eines innovativen Testverfahrens. Auch in diesem Forschungsprojekt spielen die Testsysteme im zellbiologischen Labor der Universität eine wichtige Rolle.⁴

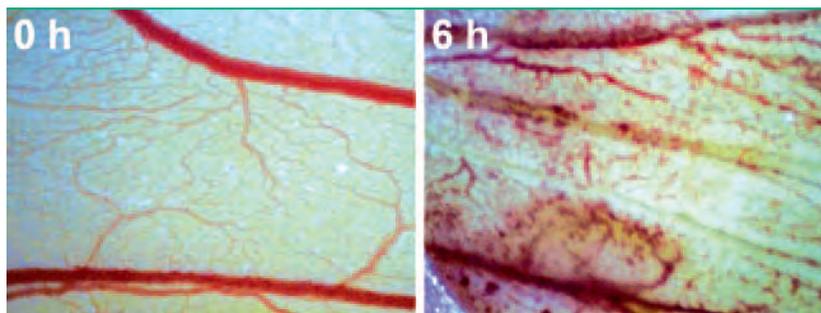
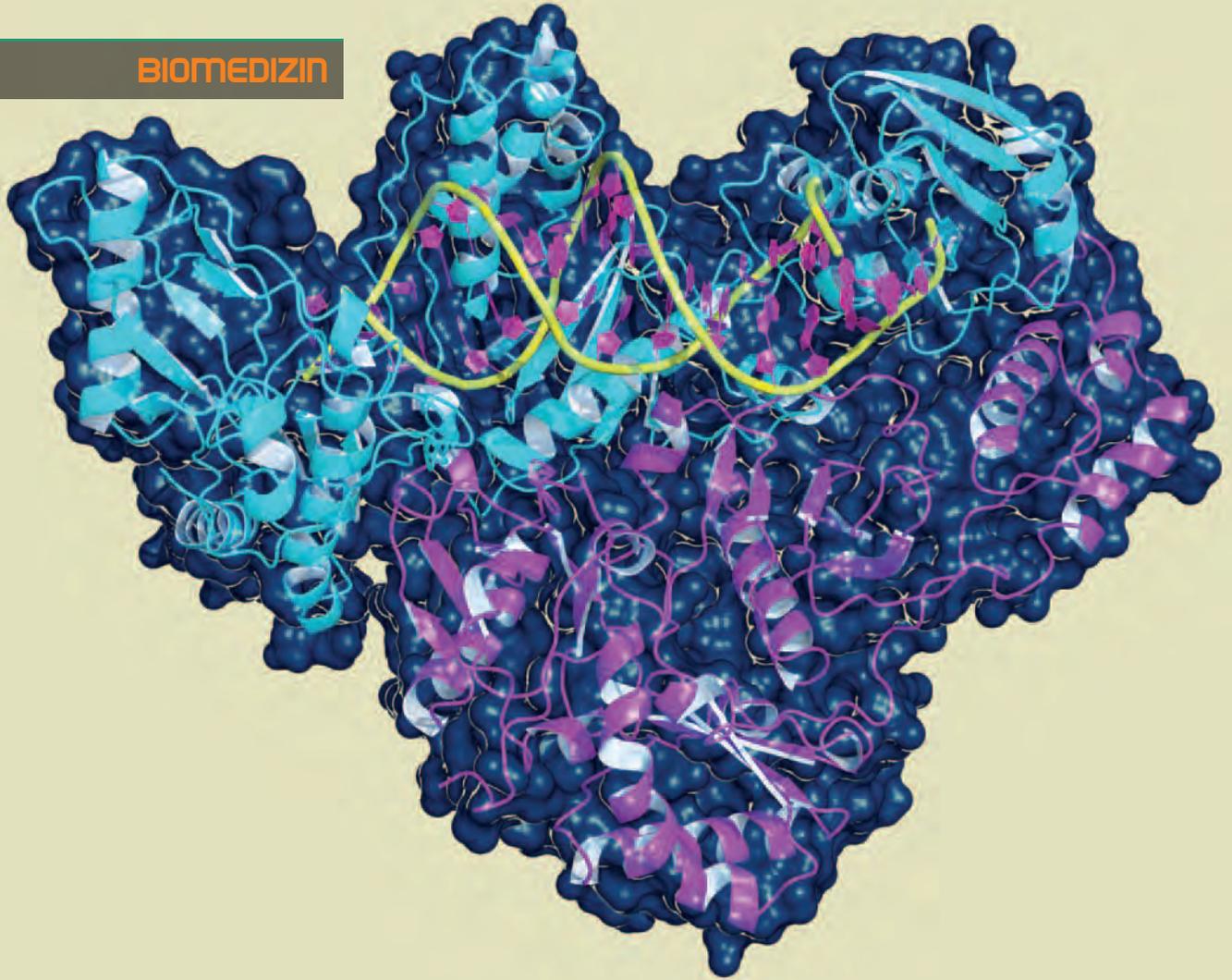


Abb. 7: Zerstörte Blutgefäße und Ausblutungen (re.) auf der CAM befruchteter Hühnereier sind die Folge der Behandlung mit vaskular-disruptiven Verbindungen. Nach nur 6 Stunden sind die intakten Blutgefäße (li.) massiv beschädigt (Mikroskopische Aufnahmen: Florian Schmitt).

- 1 Vgl. Statistisches Jahrbuch 2015, hrsg. vom Statistischen Bundesamt, Wiesbaden.
- 2 Vgl. Dazu das Patent von R. Schobert, B. Biersack und T. Mueller: Combretastatin analogs for use in the treatment of cancer, EP 2 566 851 B1 (2015); WO 2011/138409.
- 3 K. Mahal et al.: 4-(1-Ethyl-4-anisyl-imidazol-5-yl)-N-hydroxycinnamide – A new pleiotropic HDAC inhibitor targeting cancer cell signalling and cytoskeletal organization, in: *Experimental Cell Research*, Vol. 336, Issue 2, pp. 263–275, doi: 10.1016/j.yexcr.2015.06.008
- 4 Das Kooperationsprojekt wird aus dem Zentralen Innovationsprogramm Mittelstand (ZiM) des Bundesministeriums für Wirtschaft und Energie gefördert.



■ BIRGITTA WÖHRL
ANNA SCHNEIDER-FUCHS

Forschung gegen AIDS

NEUARTIGE WIRKSTOFFE HEMMEN DAS HUMANE IMMUNDEFIZIENZVIRUS (HIV)

■ Die Struktur der Reversen Transkriptase (RT) von HIV, gebunden an DNA (sst).

Nach aktuellen Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation WHO sind derzeit ungefähr 36 bis 40 Millionen Menschen mit dem Humanen Immundefizienzvirus (HIV) infiziert, davon 26 bis 28 Millionen allein im südlichen Afrika. Trotz intensiver Forschung ist es bisher nicht gelungen, einen wirksamen Impfstoff gegen HIV zu entwickeln. Das Virus infiziert eine spezielle Gruppe von T-Lymphozyten im Blut, die für das Immunsystem unverzichtbar sind und als T4-Helferzellen bezeichnet werden. Ohne Behandlung führt die Infektion im Laufe von einigen Jahren zum erworbenen Immunschwächesyndrom AIDS (*Acquired Immunodeficiency Syndrome*). Im Endstadium der Krankheit ist das Immunsystem soweit zerstört, dass der Körper sich nicht mehr gegen Infektionen wie Lungenentzündung oder Tuberkulose wehren kann und die Patienten daran sterben.

Bis heute gelingt es nicht, das Virus vollständig aus dem Körper eines Infizierten zu eliminieren und AIDS zu heilen. Allerdings wurden zahlreiche Medikamente entwickelt, die verschiedene Proteine des Virus zielgenau angreifen. Diese Wirkstoffe hemmen entweder die Aufnahme des Virus in die Zelle, oder sie unterdrücken die Aktivität viruseigener Enzyme. Auf diese Weise hindern sie das Virus daran, sich immer weiter zu vermehren und im Körper auszubreiten.

EINE NEUARTIGE KOMBINATIONSTHERAPIE

Nach einer Infektion mit HIV hängt es wesentlich von der Virusmenge im Blutplasma ab, ob und wie schnell AIDS-Symptome auftreten. Deswegen behandelt man Patienten, wenn möglich, kurz nach der erfolgten Infektion mit einer neuartigen Kombinationstherapie. Hierbei werden drei oder vier antivirale Präparate gleichzeitig verabreicht, weshalb die Therapie auch als HAART (*Highly Active Antiretroviral Therapy*) bezeichnet wird. Jeder Wirkstoff greift ein anderes virales Zielprotein an und hemmt dieses. Infolge der gezielten Kombination der Wirkstoffe wird die Virusvermehrung herabgesetzt, so dass beim HIV-Infizierten der Ausbruch der Krankheit AIDS verhindert oder zumindest verzögert werden kann. Dies gelingt allerdings nur, wenn die Medikamente vorschriftsmäßig und dauerhaft eingenommen werden. Bei fehlerhafter oder unregelmäßiger Einnahme treten innerhalb kurzer Zeit resistente Viren auf, die gegen die verabreichten Substanzen unempfindlich sind und sich daher ungehindert im Körper vermehren können.

URSACHE FÜR DIE HIV-VERMEHRUNG: DIE REVERSE TRANSKRIPTASE (RT)

Ein Enzym, das für die Vermehrung des HIV im infizierten Organismus des Menschen eine entscheidende Rolle spielt, ist die Reverse Transkriptase (RT). Nach einer Infektion bindet HIV zunächst von außen an die Zellmembran. Sobald es aber ins Innere der Zelle – in das Zytoplasma – eingeschleust worden ist, wird die RT aktiv. Das Enzym löst in der Zelle einen Vorgang aus, der in einer nicht-infizierten Zelle normalerweise nicht vorkommt: die Reverse Transkription. In einer nicht-infizierten Zelle des Menschen findet nur die Transkription statt. Dabei wird die in den Chromosomen enthaltene Desoxyribonukleinsäure (DNA), welche die Erbinformationen enthält, in Ribonukleinsäure (RNA) umgeschrieben; diese wird dann ihrerseits zur Herstellung von Proteinen verwendet. Bei der Reversen Transkription, die von der viruseigenen RT in Gang gesetzt wird, handelt es sich um den umgekehrten Vorgang: Die nur aus einem einzigen Strang bestehende RNA des Virus, sein Genom, wird in doppelsträngige DNA umgewandelt.

Weil das Genom des Menschen aus doppelsträngiger DNA besteht, kann das Virusgenom in seiner neuen DNA-Form darin eingebaut werden. Diese Aufgabe übernimmt das virale Enzym Integrase. Es macht das Virusgenom zu einem festen Bestandteil des Genoms der ‚Wirtszelle‘. So nistet sich HIV in den Zellen des menschlichen Organismus ein und ist imstande, sich kontinuierlich auf einem niedrigen Level zu vermehren. Dadurch verursacht es eine chronische Infektion, die zum Ausbruch von AIDS zu führen droht.

DIE RT ALS ZIELPROTEIN NEUER WIRKSTOFFE

Vor diesem Hintergrund richten sich Therapien, die diese Erkrankung möglichst verhindern sollen, insbesondere gegen die Reverse Transkriptase (RT). Sie ist Zielprotein von Wirkstoffen, die das Enzym an seiner Aktivität hindern sollen und deshalb als Inhibitoren bezeichnet werden (lat. *inhibere*: hemmen). Die Entwicklung solcher Wirkstoffe steht allerdings vor einer grundsätzlichen Herausforderung:

„UM MULTIRESISTENTE VIRENSTÄMME EFFEKTIV BEKÄMPFEN ZU KÖNNEN, IST DIE ENTWICKLUNG NEUARTIGER INHIBITOREN VON GROSSER BEDEUTUNG.“

AUTORINNEN



Prof. Dr. Birgitta Wöhr ist Professorin am Lehrstuhl Biopolymere der Universität Bayreuth.



Dr. Anna Schneider-Fuchs war bis 2016 Mitarbeiterin in der Forschungsgruppe von Prof. Dr. Birgitta Wöhr.



Abb. 1: Prof. Dr. Birgitta Wöhr in einem der Laboratorien am Lehrstuhl Biopolymere der Universität Bayreuth (Foto: Christian Wißler).

zung: HIV ist ein sehr variationsfähiges Virus und hat auf die bisher entwickelten Medikamente mit der Ausbildung von Resistenzen reagiert. Schon heute gibt es Virenstämme, die nicht nur gegen einen einzelnen, sondern gegen mehrere Inhibitoren unempfindlich sind. Solche multiresistente Viren unterlaufen antivirale Therapien, vermehren sich ungehindert und sind in großer Anzahl im Blut nachweisbar. Um diese Virenstämme effektiv bekämpfen zu können, ist die Entwicklung neuartiger Inhibitoren von großer Bedeutung.

NEUE INHIBITOREN GEGEN MULTIRESISTENTE VIRENSTÄMME

Dies war der Ausgangspunkt eines von Prof. Birgitta Wöhr geleiteten Forschungsprojekts an der Universität Bayreuth. Zunächst wurde die RT eines multiresistenten Virusstammes untersucht, der zuvor aus dem Blut eines AIDS-Patienten isoliert worden war. Das Ergebnis: Die Aminosäuresequenz dieses Enzyms unterscheidet sich drastisch von der RT eines Virusstammes, der noch nie mit antiviralen Medikamenten in Kontakt war. Insgesamt 45 Aminosäuren hatte das resistente Virus in seiner RT ausgetauscht.¹ Gibt es Inhibitoren, die das Enzym in dieser neuen Gestalt wirkungsvoll angreifen und lahmlegen können? Solche Wirkstoffe zu finden, war das Ziel der Bayreuther Forschungsarbeiten. Sie führten – in Zusammenarbeit mit Prof. Enzo Tramontano an der Universität Cagliari/ Italien – zu einem vielbeachteten Forschungserfolg.

Zum Verständnis dieses Erfolgs ist ein genauer Blick in den Ablauf der Reversen Transkription erforderlich. Die Umwandlung der einzelsträngigen Virus-RNA in doppelsträngige DNA verläuft in drei Stufen (Abb. 2):

- Zunächst wird der erste DNA-Strang hergestellt, wobei die Virus-RNA als Matrize dient. Es entsteht ein Hybrid, das aus einem RNA- und einem DNA-Strang besteht.
- Anschließend wird die RNA in diesem Hybrid abgebaut.
- Jetzt erst wird der zweite DNA-Strang synthetisiert.

Wenn die virale RT diese dreistufige Umwandlung bewerkstelligt, kommen nacheinander unterschiedliche molekulare Bereiche dieses Enzyms zum Einsatz. Für die DNA-Synthese (A und C) wird die Aktivität der Polymerase benötigt; beim RNA-

Abbau (C) ist eine Ribonuklease, die RNase H, aktiv. Ohne diese räumlich klar unterscheidbaren ‚Aktivitätszentren‘ der RT – sie werden in der Forschung auch als Domänen bezeichnet – wäre die Reverse Transkription nicht möglich.

Alle bisher entwickelten und in Anti-HIV-Therapien eingesetzten RT-Inhibitoren zielen darauf ab, die Polymerase-Aktivität zu hemmen. Um parallel dazu auch die RNase H-Aktivität zu inaktivieren, wurden in den letzten zehn Jahren zwar verschiedenartige Inhibitoren entwickelt; doch keiner dieser Wirkstoffe steht Patienten in Form von zugelassenen Arzneimitteln zur Verfügung. Die Forschungsarbeiten an den Universitäten Bayreuth und Cagliari führten aber nun zu Ergebnissen, die die Entwicklung wirksamer Anti-HIV-Therapien in diesem Punkt weiter voranbringen können:

- Eine Reihe kleiner chemischer Verbindungen ist in der Lage, an die RNase H der RT zu binden und deren Aktivität deutlich herabzusetzen (Abb. 3).
- Dies gilt sogar für den in Bayreuth untersuchten Virusstamm. Auch die RNase H der stark veränderten RT in diesem *multiresistenten* HIV wird durch die neu entdeckten Inhibitoren gehemmt.²
- Darüber hinaus zeichnen sich diese kleinen Inhibitormoleküle durch eine geringe Toxizität in Zellkulturen aus: ein Indiz dafür, dass bei Wirkstoffen die Risiken unerwünschter Nebenwirkungen eher gering sein könnten.

Abb. 2: Die Reverse Transkription: vom einzelsträngigen viralen RNA-Genom zur doppelsträngigen DNA.

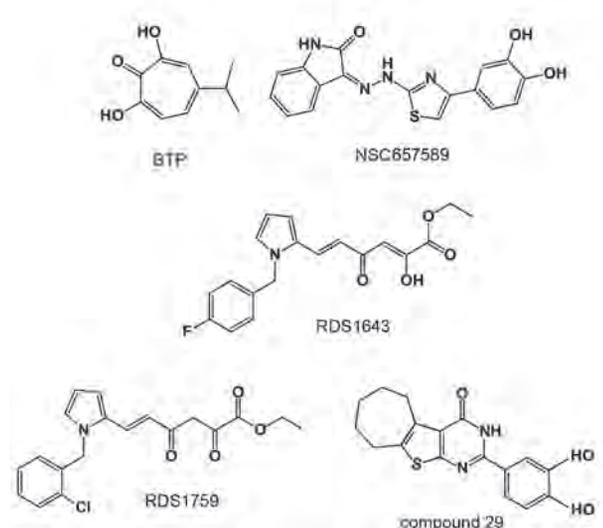
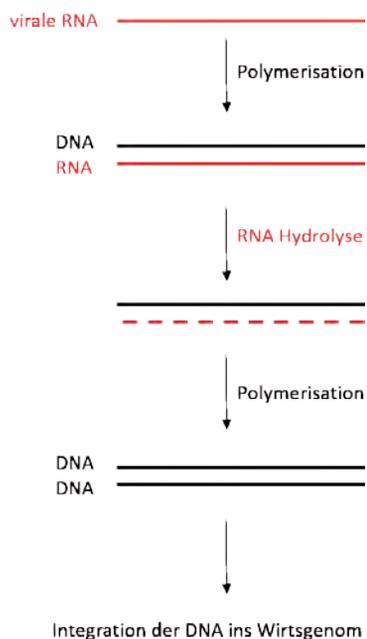


Abb. 3: Kleine Moleküle, die als RNase H-Inhibitoren wirksam sind. Der Inhibitor RDS 1643 wurde für die NMR-spektroskopischen Untersuchungen an der Universität Bayreuth verwendet.

NMR-SPEKTROSKOPIE: SCHLÜSSELTECHNOLOGIE FÜR DIE WEITERE FORSCHUNG

Von zentraler Bedeutung für dieses Forschungsprojekt war die magnetische Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) (Abb. 5). Diese Technologie eignet sich besonders gut, um die Wechselwirkungen kleiner Inhibitormoleküle mit Proteinen zu untersuchen. Gibt es also die Möglichkeit zu zeigen, wo die neu entdeckten Inhibitoren an die RNase H der RT binden?

Weil die Reverse Transkriptase (RT) des HIV eine RNase H besitzt, die nicht sehr stabil ist, konzentrierten sich die Bayreuther Forschungsarbeiten zunächst auf ein mit HIV verwandtes Virus.³ Spektroskopische Untersuchungen, komplexe Analysemethoden und ein Modellierungsprogramm machten sichtbar, wo genau einer der neu entdeckten Inhibitoren an die RNase H bindet.⁴ Diese hat große Ähnlichkeit mit der RNase H in der RT des HIV. Ein Vergleich der dreidimensionalen Strukturen der beiden Proteine führte so zu präzisen Erkenntnissen darüber, welche Aminosäuren in der RNase H des HIV an der Bindung des Inhibitors beteiligt sind (Abb. 4).

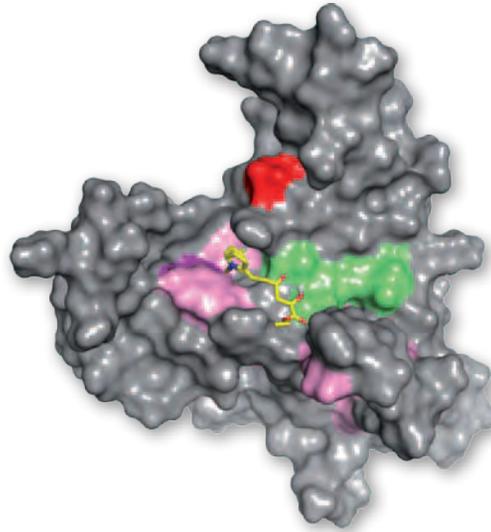


Abb. 4: Struktur der RNase H mit Inhibitormolekül RDS1643. Die dreidimensionale Struktur der RNase H ist grau, das aktive Zentrum der RNase H grün dargestellt. Die Aminosäuren, die durch die Inhibitorbindung beeinflusst werden, sind durch verschiedene Rotabstufungen markiert (Grafik: Anna Schneider-Fuchs).

Aufbauend auf diesen Strukturanalysen kann man andere funktionelle Gruppen in dieses und in weitere Inhibitormoleküle einführen, um deren Bindungsstärke und Spezifität zu erhöhen. Bei diesen weiteren Schritten, die auf dem Weg zu einem effektiven Wirkstoff gegen multiresistente HIV-Viren zurückgelegt werden müssen, wird sich die gute Zusammenarbeit der Arbeitsgruppen in Bayreuth und Cagliari erneut bewähren.

- 1 Ähnlich verhielt es sich mit anderen viralen Proteinen; vgl. M. Kožíšek et al.: Mutations in HIV-1 gag and pol compensate for the loss of viral fitness caused by a highly mutated protease, in: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (2012), Vol. 56, No. 8, pp. 4320-4330, doi: 10.1128/AAC.00465-12.
- 2 A. Schneider et al.: Biochemical characterization of a multi-drug resistant HIV-1 subtype AG reverse transcriptase: antagonism of AZT discrimination and excision pathways and sensitivity to RNase H inhibitors, in: *Nucleic Acids Research* (2016), Vol. 44, Issue 5, pp. 2310-2322, doi: 10.1093/nar/gkw060.
- 3 B. Leo et al.: Insights into the structure and activity of prototype foamy virus RNase H, in: *Retrovirology* (2012), 9:14, doi: 10.1186/1742-4690-9-14, und B. Leo et al.: The solution structure of the prototype foamy virus RNase H domain indicates an important role of the basic loop in substrate binding, in: *Retrovirology* (2012), 9:73, doi: 10.1186/1742-4690-9-73.
- 4 A. Corona et al.: Inhibition of Foamy Virus Reverse Transcriptase by Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNase H Inhibitors (2014), Vol. 58, No. 7, pp. 4086-4093, doi: 10.1128/AAC.00056-14.

Spitzentechnologie auf dem Bayreuther Campus

Die Universität Bayreuth verfügt auf dem Gebiet der magnetischen Kernresonanzspektroskopie (kurz: NMR-Spektroskopie, von nuclear magnetic resonance) über herausragende Forschungs Kompetenzen. Im Nordbayerischen Zentrum für hochauflösende NMR, das vom Lehrstuhl Biopolymere und dem Forschungszentrum für Bio-Makromoleküle (BIOmac) verwaltet wird, befindet sich seit kurzem das weltweit leistungsfähigste NMR-Spektrometer. Dieses „1-Gigahertz-Spektrometer“ eröffnet einzigartige Möglichkeiten für die Grundlagenforschung wie für die anwendungsorientierte Forschung. An der Universität Bayreuth arbeiten der Lehrstuhl für Biopolymere, das Forschungszentrum BIOmac und die ALNuMed GmbH eng zusammen, um diese Potenziale für Wissenschaft,



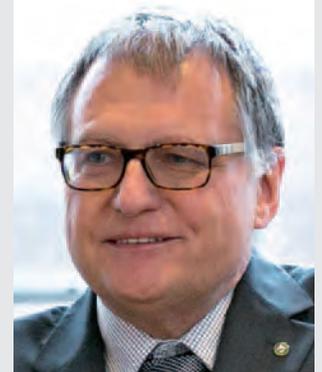
Produktentwicklung und neue Dienstleistungsangebote optimal einzusetzen. Verschiedene Projektgruppen arbeiten dabei insbesondere auf den folgenden Forschungsfeldern:

- HIV
- Antibiotika
- Allergene
- Lebensmittelanalytik

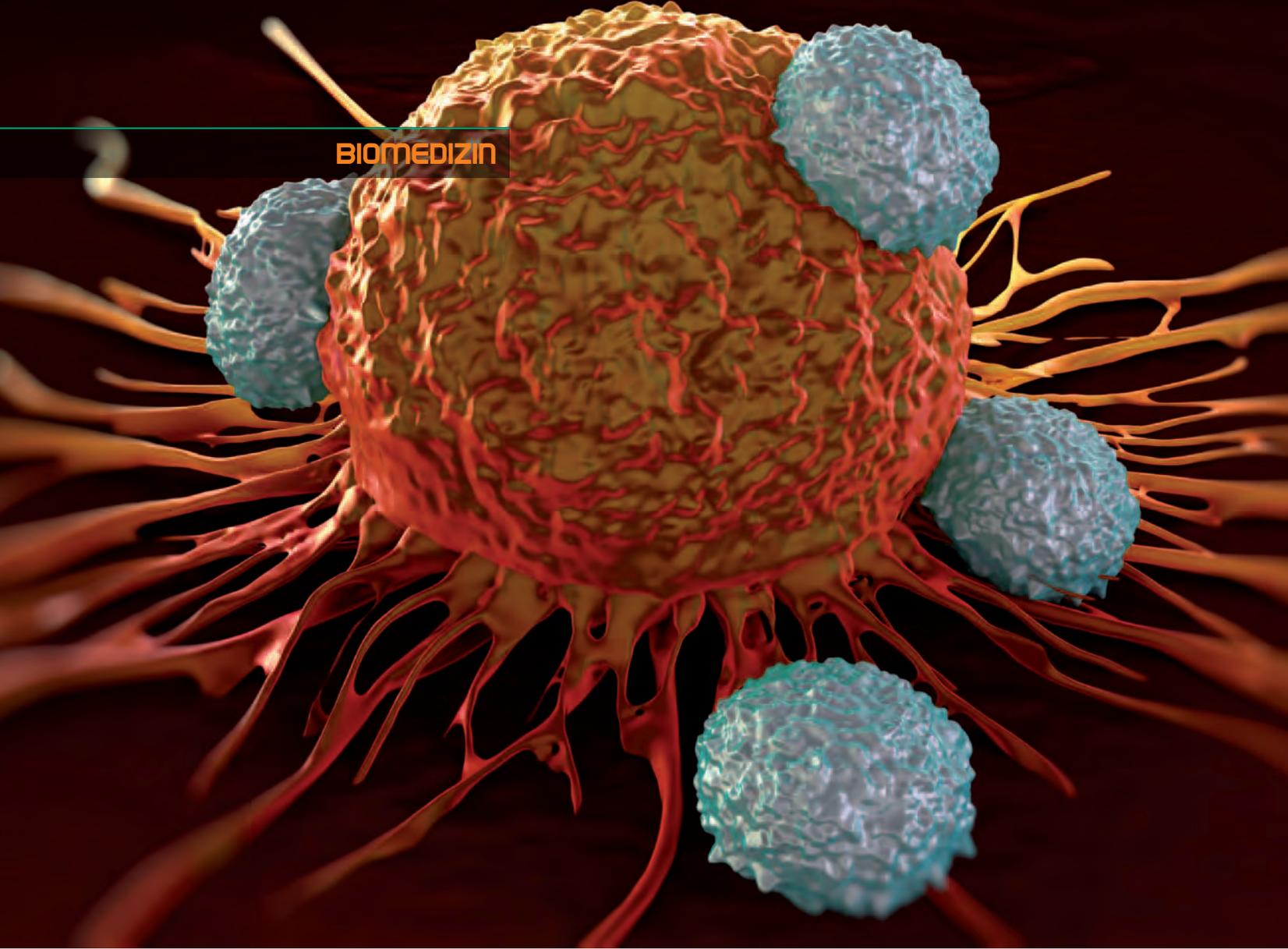
Abb. 5: Blick in die Halle für NMR-Spektroskopie des Lehrstuhls für Biopolymere; in der Mitte das neue 1 GHz-Gerät. Mit dieser Forschungstechnologie kann man beobachten, wie bestimmte Atomkerne eines Proteins in einem Magnetfeld frequenzabhängig mit elektromagnetischen Wellen in Wechselwirkung treten (Foto: Peter Kolb).

Weitere Informationen zu diesen Schwerpunkten im SPEKTRUM „Innovationen“ 1/2016, S. 50 - 53, und im SPEKTRUM „Digitalisierung“ 2/2015, S. 81.

ZUR PERSON



Prof. Dr. Paul Rösch ist Leiter des Forschungszentrums für Bio-Makromoleküle und Inhaber des Lehrstuhls Biopolymere an der Universität Bayreuth sowie Geschäftsführer der ALNuMed GmbH.



■ RUTH FREITAG
VALÉRIE JÉRÔME

Weiße Blutkörperchen kultivieren

AUF DEM WEG ZUM BIOARTIFIZIELLEN LYMPHATISCHEN GEWEBE

■ T-Lymphozyten greifen eine Krebszelle an (sst).

Das Immunsystem des Menschen ist sehr komplex und bis heute nicht in allen Details verstanden. Eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Krankheitserregern, aber auch bei der Bekämpfung von Krebszellen spielen die weißen Blutkörperchen, vor allem die B- und T-Lymphozyten. Spätestens seit der Erfindung der Impfung ist bekannt, dass sich das Immunsystem auch präventiv nutzen lässt. Neuere Ansätze zielen darauf ab, das Immunsystem von Krebspatienten über eine Impfung gegen die vorhandenen Tumore und Metastasen zu aktivieren, und lassen viele Patienten hoffen. Gegen manche Erreger, zum Beispiel das Humane Immundefizienz-Virus (HIV), konnte man hingegen bis heute keinen wirksamen Impfstoff entwickeln.

Lymphozyten werden beim Erwachsenen im Knochenmark gebildet und wandern dann zu den lymphatischen Organen wie der Milz, dem Thymus und den Lymphknoten. Wenn sie mit einem Erreger oder einer entarteten Zelle in Kontakt geraten, werden sie aktiviert und durchlaufen eine Reihe von Reifungsstadien. Am Ende steht die ausgebildete Immunantwort, die den Erreger oder auch die Krebszellen bekämpft. Gleichzeitig – und das ist mindestens ebenso wichtig wie die Bekämpfung selbst – werden Informationen über den Auslöser von sogenannten Gedächtniszellen abgespeichert. Bei einem erneuten Kontakt mit dem Erreger ist das Immunsystem dann deutlich schneller und schlagkräftiger in der Antwort.

DIE EX-VIVO-KULTIVIERUNG VON HUMANEN LYMPHOZYTEN

Die Kultivierung und Reifung menschlicher Lymphozyten außerhalb des Körpers – kurz: Ex-vivo-Kultivierung – ist aus einer Reihe von Gründen von großem Interesse. Nicht nur die medizinische Grundlagenforschung würde davon profitieren, es gibt überdies auch erste therapeutische Ansätze, bei denen solche Zellen zum Einsatz kommen. Bereits sehr weit vorangeschritten ist die *Adoptive T-Cell Therapy (ACT)* für die



Krebsbekämpfung. Hierbei werden dem Patienten körpereigene, speziell gegen seine Krebszellen gerichtete T-Lymphozyten entnommen, außerhalb des Körpers stark vermehrt und anschließend wieder zugeführt. Weitere Anwendungen, die heute diskutiert werden, sind eine grundlegende Stärkung des Immunsystems – zum Beispiel vor einer das Knochenmark zerstörenden Strahlentherapie – oder Impfungen in Fällen, in denen eine direkte Injektion des Impfstoffs in den Organismus zu risikoreich wäre.



Abb. 1: Patrick Kaiser M.Sc. und Patrick Wefing M.Sc., Doktoranden am Lehrstuhl für Bioprozesstechnik, bei der Begutachtung verkapselter T-Lymphozyten (Foto: Christian Wißler).

Die derzeitigen Verfahren, die zur Vermehrung patienteneigener T-Lymphozyten außerhalb des Körpers angewendet werden, haben allerdings erhebliche Nachteile: Sie erfordern eine massive Zufuhr von Wachstumsfaktoren, teilweise sogar von giftigen Stimulanzen. Zusätzlich sind oftmals Feeder-Zellen erforderlich; hierbei handelt es sich um teilweise genetisch modifizierte menschliche Zellen oder um Zellen anderer Spezies (zum Beispiel von Mäusen). Noch komplizierter gestaltet sich die Vermehrung und Reifung von B-Lymphozyten außerhalb des Körpers. Hier kommt erschwerend hinzu, dass viele der benötigten Wachstumsfaktoren und Stimulanzen nur bedingt im Handel erhältlich oder sehr teuer sind.

In dieser Situation sind robuste Verfahren der Ex-vivo-Kultivierung gefragt, die auf den Einsatz von Stimulanzen und Feeder-Zellen so weit wie möglich verzichten. Ausgangspunkt sind dabei immer primäre Lymphozyten, also Zellen, die direkt aus dem Gewebe eines lebenden Organismus stammen.

Abb. 2: Verkapselte T-Lymphozyten im Zellkulturbeutel (Foto: Christian Wißler).

ERFOLGREICHE FORSCHUNGSARBEITEN IN BAYREUTH UND ERLANGEN

Die Voraussetzungen für eine Ex-vivo-Kultivierung primärer Lymphozyten auszuloten, war der Ansatz eines von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) geförderten Projekts auf dem Gebiet der Bioproszesstechnik. Forschungsgruppen der Universitäten Bayreuth und Erlangen-Nürnberg haben dabei unter der Leitung von Prof. Ruth Freitag und Prof. Rainer Buchholz eng zusammengearbeitet. Während sich die Arbeiten in Erlangen hauptsächlich mit den B-Lymphozyten befassten¹, konzentrierte sich das Bayreuther Team auf die T-Lymphozyten.

Es ist ein großes Problem bei der Ex-vivo-Kultivierung von B-Lymphozyten, dass diese Zellen ohne Stimulation nach wenigen Stunden absterben. Nach einer Stimulation, zum Beispiel durch Kontakt mit bakteriellen Zellwandbestandteilen, teilen sich die Zellen hingegen und durchlaufen dann rasch mehrere Reifungsstadien. Dieser Vorgang ist unumkehrbar, und am Ende sterben die Zellen ebenfalls ab. In Erlangen gelang jedoch ein erster wichtiger Forschungserfolg: Es konnte gezeigt werden, dass man durch Kultivierung der B-Lymphozyten bei 30 °C, also deutlich unterhalb der menschlichen Körpertemperatur, die B-Lymphozyten auf bestimmten Zwischenstufen des Reifungsprozesses halten und auch stark vermehren kann. Allerdings erfolgte dieser Nachweis vorerst nur mit B-Lymphozyten von Mäusen; dabei wurden noch immer Feeder-Zellen von Mäusen benötigt.

Auch die Bayreuther Untersuchungen zur Ex-vivo-Kultivierung von T-Lymphozyten verliefen erfolgreich. Dabei wurden die Vorarbeiten mit Zellen einer menschlichen T-Lymphozyten-Krebszelllinie, den Jurkat-Zellen, durchgeführt.



Abb. 3: In einem Bayreuther Labor für Bioproszesstechnik entnimmt Dr. Valérie Jérôme eine Probe aus einer Zellkultur. (Foto: Christian Wißler).

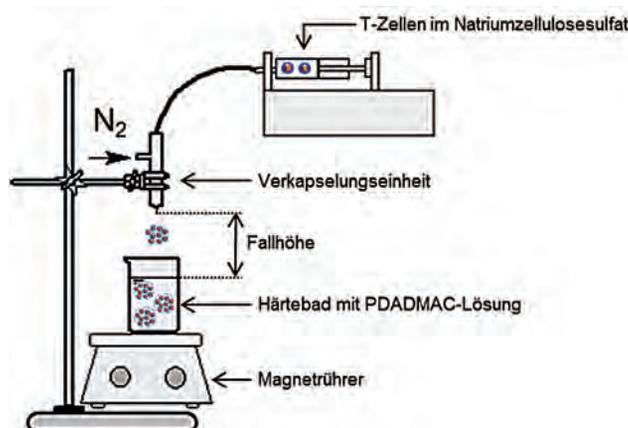


Abb. 4: Aufbau der Apparatur zur Verkapselung von T-Lymphozyten, die von Bayreuther Master-Studierenden entwickelt wurde (Grafik: Dr. Valérie Jérôme/ Patrick Kaiser).

VERKAPSELTE LYMPHOZYTEN

Der Lehrstuhl für Bioproszesstechnik in Bayreuth hat ein Verfahren entwickelt, das es ermöglicht, T-Lymphozyten in halbdurchlässige Polyelektrolytkapseln mit einem Durchmesser von weniger als 1 mm einzuschließen. Dazu werden die T-Lymphozyten bzw. die Jurkat Zellen in einer Lösung suspendiert, die bis zu 2 Gewichtsprozent eines negativ geladenen Polyelektrolyten (gut verträgliches Natriumzellulosesulfat) enthält. Dessen Moleküle sind negativ geladen. Mittels einer speziellen Apparatur (Abb. 4) werden kleine Tröpfchen dieser Suspension gebildet und in ein „Härtebad“ getropft, das rund 1 Gewichtsprozent eines positiv geladenen Polyelektrolyten (Poly(diallyldimethyl)-Ammoniumchlorid, kurz: PDADMAC) enthält. Die beiden Polyelektrolyte ziehen sich elektrostatisch an und bilden auf der Oberfläche der Suspensionskügelchen eine Membran. Je nachdem, wie lange man wartet, wird die Membran mehr oder weniger dick. Diese Membran hat eine Siebwirkung. Große Moleküle, wie Eiweißstoffe oder auch die T-Lymphozyten selbst, werden zurückgehalten. Kleine Moleküle hingegen können die Membran gut passieren, zum Beispiel Nährstoffe (Glukose, Aminosäuren) und Sauerstoff, aber auch Laktat und andere Abfallprodukte des Stoffwechsels.

„T-LYMPHOZYTEN GESUNDER
SPENDER KONNTEN BEREITS IN
DEN KAPSELN VERMEHRT UND
CHARAKTERISIERT WERDEN.“

So lassen sich die T-Lymphozyten gut von außen über ein Nährmedium versorgen. Gleichzeitig wird es ihnen sehr leicht gemacht, ihre unmittelbare Umgebung innerhalb der Kapsel zu ihren Gunsten zu beeinflussen. Denn die für die Entwicklung der Zellen wichtigen Signalmoleküle und Wachstumsfaktoren sind fast ausnahmslos Eiweißstoffe. Diese werden entweder in geringen Mengen schon vor dem Verkapseln zugesetzt und bleiben auch weiterhin in der unmittelbaren Umgebung der Zellen, weil sie die Kapselmembran wegen ihrer Größe nicht passieren können; oder aber sie werden von den Zellen selbst produziert. Der Zusatz großer Mengen an teuren Signalmolekülen ins Nährmedium ist dann nicht mehr notwendig.

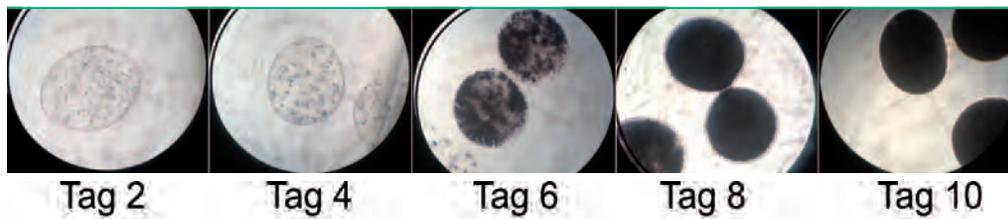


Abb. 5: Zellwachstum in den Kapseln. Von Tag 2 bis Tag 10 füllen sich die Kapseln mit Zellen, bis zum Schluss gewebeähnliche Zelldichten erreicht werden (Lichtmikroskopische Aufnahmen: Patrick Kaiser).

Unter diesen Umständen wachsen die Zellen in den Kapseln zu gewebeähnlichen Zelldichten heran (Abb. 5). Es entstehen dabei mehr als 30 Millionen Zellen pro Milliliter Kapselvolumen. Die enge räumliche Nähe, die sich in einem Standard-Zellkultur-Gefäß im Brutschrank nicht herstellen ließe, aber auch das Eingeschlossensein in einer Kapsel stimulieren die Entwicklung der Zellen in die gewünschte Richtung. Ein anderer großer Vorteil des gewählten Kapselmateriale ist, dass sich die Kapseln relativ leicht mit Hilfe von Enzymen aufschließen lassen.² So lassen sich die Zellen schonend wieder freisetzen. Sie können dann mit Standardverfahren zellbiologisch untersucht und charakterisiert werden.

ANWENDUNGEN IM BIOREAKTOR

Bei Jurkat-Zellen führt die Verkapselung nachweislich zu signifikant höheren Zellteilungsraten und einer deutlich verlängerten Wachstumsphase.³ Gleichzeitig ist die Apoptotendenz – also die Neigung der Zellen, ein spezifisches „Selbstmord“-Programm auszulösen – deutlich verringert. Wie die Bayreuther Forschungsarbeiten ebenfalls gezeigt haben, wird das starke Wachstum nicht etwa durch eine unbeabsichtigte Stimulation der Zellen verursacht. Die gezielte Stimulation der verkapsel-

ten Zellen ist nach wie vor möglich. Auch T-Lymphozyten gesunder Spender konnten bereits in den Kapseln vermehrt und charakterisiert werden.

Verkapselte Zellen lassen sich leichter als freie Zellen in einem kontinuierlich betriebenen Bioreaktor verwenden; beispielsweise in einem Festbettreaktor, wo die Kapseln dauerhaft durchströmt werden, oder in einem Wirbelschichtreaktor (Abb. 6).⁴ Beim Wirbelschichtreaktor wird das Nährmedium von unten in den Reaktor gepumpt – schnell genug, um die Kapseln aufzuwirbeln und dadurch gut zu durchmischen; aber nicht schnell genug, um die Kapseln mit der Flüssigkeit nach oben aus dem Reaktor hinauszutragen. In beiden Fällen werden die verkapselten Zellen stabil im Bioreaktor gehalten. Jetzt kann man untersuchen, wie sie beispielsweise auf störende oder stimulierende Substanzen reagieren.

FAZIT UND AUSBLICK

Primäre Lymphozyten lassen sich unter geeigneten Bedingungen auch außerhalb des Körpers gezielt vermehren. Damit ergeben sich spannende Perspektiven für die Forschung und Entwicklung im Bereich der angewandten Immunologie. Bisher allerdings wurden T- und B-Lymphozyten meistens nur isoliert betrachtet. Im Immunsystem arbeiten sie aber in vielfältiger Weise miteinander sowie mit anderen Zellarten zusammen. Die kommende Herausforderung bei der Entwicklung eines bioartificialen lymphatischen Gewebes in Bayreuth wird es sein, diese Interaktionen in einer gemeinsamen Kultivierung unterschiedlicher Zellarten abzubilden.

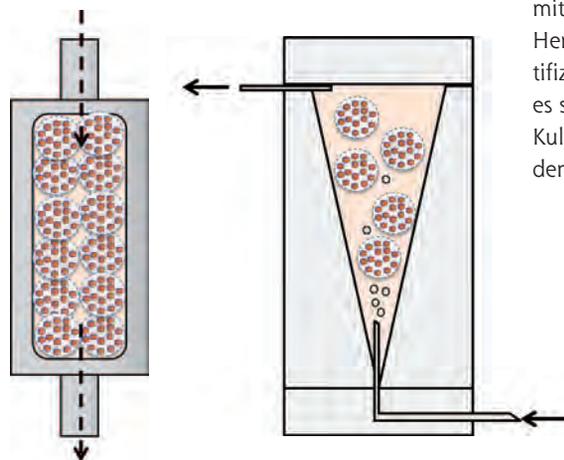
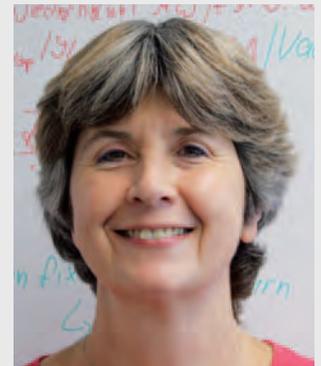


Abb. 6: Im Festbettreaktor (li.) können sich die Kapseln mit den darin eingeschlossenen T-Lymphozyten nicht bewegen und werden von einer Nährflüssigkeit durchströmt; im Wirbelschichtreaktor (re.) werden sie von der Nährflüssigkeit in ständiger Bewegung gehalten (Grafiken: Dr. Valérie Jérôme).

AUTORINNEN



Prof. Dr. Ruth Freitag ist Inhaberin des Lehrstuhls für Bioprozesstechnik an der Universität Bayreuth.



Akad. Oberrätin Dr. Valérie Jérôme ist wissenschaftliche Mitarbeiterin (Senior Staff Scientist) am Lehrstuhl für Bioprozesstechnik.

- 1 K. Zambrano et al.: Prolonged ex vivo expansion and differentiation of naive murine CD43- B spleenocytes, in: *Biotechnology Progress* (2016), Vol. 32, Issue 4, pp. 978–989.
- 2 M. Werner et al.: Use of the mitochondria toxicity assay for quantifying the viable cell density of microencapsulated jurkat cells, in: *Biotechnology Progress*, Vol. 29, Issue 4, pp. 986–993.
- 3 M. Werner et al.: High cell density cultivation of human leukemia T cells (Jurkat cells) in semipermeable polyelectrolyte microcapsules, in: *Engineering in Life Sciences* (2015), Vol. 15, Issue 4, pp. 357–367.
- 4 P. Kaiser et al.: Cell retention by encapsulation for the cultivation of Jurkat cells in fixed and fluidized bed reactors, in: *Biotechnology and Bioengineering* (2014), Vol. 111, Issue 12, pp. 2571–2579.

A scientist with glasses and a white lab coat is working in a laboratory. He is wearing white gloves and holding a clear plastic flask containing a red liquid. He is looking down at the flask. In the background, there is a large piece of equipment, likely a bioreactor, with various tubes and wires connected to it. The word "BIOMEDIZIN" is written in orange on a black background in the top left corner.

BIOMEDIZIN

■ DANIEL SEITZ
STEFAN SCHUSTER

Von Zellkulturen bis zu hochwertigen Implantaten

EINE BIOMEDIZINISCHE
PLATTFORM FÜR DIE
UNIVERSITÄT BAYREUTH

■ Florian Gaudig, TA, und Leiter des Zelllabors setzt einen Bioreaktor in Betrieb. In der Flasche befindet sich das rot gefärbte Medium, das den Zellen Nährstoffe bringt (Foto: Christian Wißler).

Erkenntnisse aus der Grundlagenforschung für biomedizinische Anwendungen zu nutzen und innovative Entwicklungen in der Medizintechnik voranzutreiben, ist das Ziel der „Arbeitsgemeinschaft Regenerative Medizin“ an der Universität Bayreuth. Diese Forschungsgruppe – kurz: AG RegMed – wurde hier 2012 an dem von Prof. Stefan Schuster geleiteten Lehrstuhl für Tierphysiologie eingerichtet. Die Friedrich-Baur-Stiftung mit Sitz in Altenkunstadt, die seit vielen Jahren die anwendungsorientierte Forschung im Bereich der Medizin unterstützt, fördert Projekte der AG RegMed über eine Zusammenarbeit mit der Forschungsgruppe um Prof. Volkmar Jansson am Klinikum der LMU München.

Die im folgenden vorgestellten Forschungsarbeiten stehen beispielhaft für die Vielfalt und Dynamik der Projekte, die in der AG RegMed bearbeitet werden. Sie haben bereits zu vielbeachteten Ergebnissen geführt. Daran sind nicht zuletzt auch Bayreuther Studierende beteiligt, die in ihren Bachelor- oder Masterarbeiten spezielle forschungsbezogene Fragen untersucht haben.

NERVENZELLEN IM LABOR KULTIVIEREN

Zebrafische besitzen die ungewöhnliche Fähigkeit, abgestorbene oder beschädigte Nervenzellen durch neue zu ersetzen. Noch die erwachsenen Tiere besitzen neurologische Stammzellen und können selbst stärkere Verletzungen des Gehirns reparieren. Es wäre für die neurologische und die medizinische Forschung eine wertvolle Unterstützung, wenn sich diese Prozesse im Reagenzglas reproduzieren und untersuchen ließen. Um im Labor entsprechende Zellkulturen anzulegen, benötigt man aber neuronale Vorläuferzellen, sogenannte Neuroprogenitoren. Hierbei handelt es sich um unreife Nervenzellen, die bereits für einen bestimmten Funktionsbereich, beispielsweise das Gehirn oder die Wirbelsäule, vorgeprägt sind.

Bei Forschungsarbeiten für seine Bayreuther Masterarbeit ist es Georg Welzel gelungen, ein leicht handhabbares und kostengünstiges Verfahren für die Isolierung dieser Zellen zu etablieren (Abb. 1). Die Pointe liegt darin, dass die Zellen mithilfe eines speziellen Erkennungsmoleküls, genannt PSA-NCAM, aus einer Zellsuppe herausgefiltert werden, die durch Zerkleinerung von Fischeiern hergestellt wird (Abb. 2). Die Verwendung von Fischeiern ist –

im Vergleich zu neugeborenen Mäusen – nicht nur in ethischer Hinsicht ein Fortschritt. Sie bietet auch wissenschaftliche Vorteile, weil die Isolierung der Zellen aus Hunderten von Eiern wesentlich zuverlässiger ist.

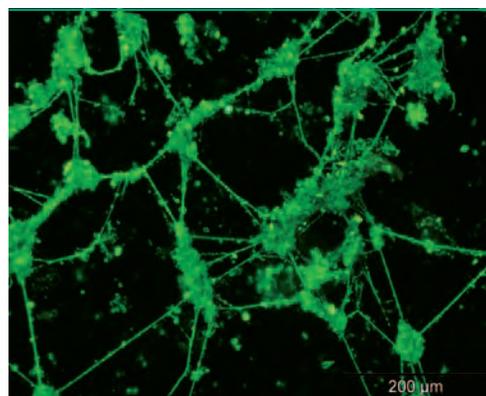
Die aus den Vorläuferzellen entstandenen Nervenzellkulturen können nun als Modell für eine breite Palette von Forschungsarbeiten dienen – sei es in der Molekularbiologie, der Neurophysiologie oder der Biomedizin.

BAUSTEINE DES TISSUE ENGINEERING

Ein Arbeitsschwerpunkt der AG RegMed ist das Tissue Engineering. Bei dieser biomedizinischen Technik macht man sich die Wachstums- und Entwicklungsprozesse lebender Zellen zunutze, um gezielt neues Gewebe neu aufzubauen. Forschungen auf diesem Gebiet sind daher insbesondere für die regenerative Medizin von hohem Interesse. Bei der Kultivierung der Gewebezellen kommen vor allem vier Faktoren zum Einsatz:

- Zellkulturmedien: spezielle Nährstoffmischungen als Ersatz für das Blutserum
- Wachstumsfaktoren: aus dem Körper extrahierte Signalmoleküle
- Scaffolds: Gerüste, die sowohl die Form des Gewebes als auch seine innere Struktur vorgeben und über die Wechselwirkung mit den Zellen deren Entwicklung direkt steuern
- Physiologische Umgebung: Sauerstoff, Nährstoffe und die Strömung des Mediums beeinflussen die Entwicklung der Zellen

Die Gerüste bestehen idealer Weise aus Materialien, die zuerst die Entwicklung der Zellen hin zum gewünschten Gewebe (zum Beispiel Knorpel,



AUTOREN



Dipl.-Biol. Daniel Seitz ist Principal Investigator der Arbeitsgruppe Regenerative Medicine am Lehrstuhl für Tierphysiologie und Geschäftsführer des Friedrich-Baur BioMed Center in Bayreuth.



Prof. Dr. Stefan Schuster ist Inhaber des Lehrstuhls für Tierphysiologie an der Universität Bayreuth.

Abb. 1 (links): Aus Zebrafischeiern isolierte Vorläufer haben Nervenzellen gebildet, die sich in der Zellkultur vernetzen (Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme: Georg Welzel).

Abb. 2 (rechts): Ein hochmodernes Gerät hilft bei der Isolierung empfindlicher Zellen (Foto: FB BioMed Center).



Abb. 5 (rechts): Knochenzellen (rot) wachsen in die Zwischenräume des gedruckten Knochenersatzmaterials ein – so richtig wohl fühlen sie sich aber nur am Rand des Porenkanals (links) (Mikroskopische Aufnahme: Maria Schröder).



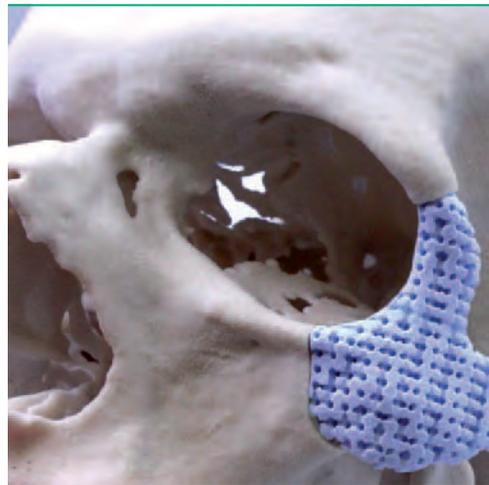
Abb. 3: Boneplan® Knochenmodelle werden im 3D-Drucker realisiert (Foto: FB BioMed Center).

Abb. 4: Ein individuelles Implantat aus resorbierbarer Keramik (blau) wurde in einen Modellschädel eingepasst (Foto: FB BioMed Center).

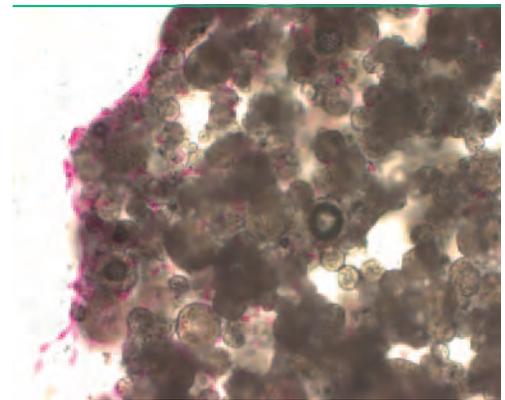
Knochen oder Nervengewebe) begünstigen und danach spurlos abgebaut werden, sobald die Regeneration abgeschlossen ist.

KNOCHENERSATZMATERIALIEN NACH MASS: NEUE IMPLANTATE AUS DEM 3D-DRUCKER

Wenn es darum geht, gesundes Knochengewebe neu aufzubauen, verwendet man als Gerüste sogenannte Knochenersatzmaterialien. Diese werden in den Körper eingesetzt, wenn schief gewachsene Knochen korrigiert oder fehlendes Knochengewebe nach Tumorerkrankungen neu gebildet werden soll. Am häufigsten werden sie vor dem Setzen von Zahnimplantaten bei der „Augmentation“, dem Aufbau des Kieferknochens, verwendet. Die Friedrich-Baur BioMed Center gGmbH (vgl. S. 35) verfügt über eine Anlage, mit der Knochenersatzmaterialien im 3D-Druck hergestellt werden können. So ist es möglich, dass die Gerüste exakt diejenige Struktur haben, die für den individuellen Patienten jeweils benötigt wird (Abb. 3 und 4). Die beim 3D-Druck verwendeten Materialien bestehen aus dem gleichen Mineral wie der Knochen selbst und können vollständig abgebaut werden, wenn neu gebildeter Knochen sie ersetzt.



Kanäle im Knochen sind verantwortlich für seine Durchblutung und ermöglichen so dessen ständigen Ab- und Aufbau sowie die zahlreichen weiteren Funktionen. Entsprechende Strukturen sind daher eine Grundvoraussetzung für den Erfolg eines Knochenersatzmaterials. Das im FB BioMed Center produzierte Material enthält Kanäle, die gezielt darin eingedruckt werden, und – dies ist eine Besonderheit – auch kleine Poren. Diese Poren sind Gegenstand spezieller Forschungsarbeiten der AG RegMed.



In ihrer Masterarbeit untersuchte Maria Schröder, wie sich Knochenzellen aus Vorläufern entwickeln – und zwar einerseits in den Kanälen, andererseits in den Poren. Für diesen Vergleich nutzte sie die in der Arbeitsgruppe von Daniel Seitz entwickelten Bioreaktoren. Nach 28 Tagen Kultivierung unter ständiger Durchströmung waren die Zellen in den großen Kanälen wesentlich stärker gewachsen (Abb. 5). Die schwache Bildung neuer Knochen-substanz in den kleinen Poren war schon bekannt, unklar aber war der Grund hierfür – denn bisher galten Poren mit einer Größe zwischen 100 und 150 Mikrometern als groß genug für das Einwachsen von Knochen. Sollte es geometrische Gründe haben, dass die Zellen sich nicht weiter entwickeln? Die Bayreuther Studentin konnte zeigen, dass die Zellen auch in den engen Poren durchaus zur Knochenbildung bereit sind. Aber eine unzureichende Versorgung mit Nährstoffen hindert sie am Wachstum, so dass sie keine stabile Knochenmatrix bilden können. Diese wichtigen Befunde zeigen, dass feine Poren durchaus für die Feinstrukturierung von Knochenersatzmaterialien genutzt werden könnten, wenn das Problem der Versorgung gelöst wird.

In der AG RegMed wird aber nicht nur am Verhalten der Zellen geforscht. Es steht zugleich eine hochmoderne Technologie zur Verfügung, um neu entwickelte Knochenersatzmaterialien zu testen. Hierbei kommen sogenannte Bioreaktoren zum Einsatz, die über Pumpen den Blutkreislauf simulieren. Sie können sogar über Motoren und Stempel die natürliche Belastung nachempfinden. Dieser mechanische Druck, der zum Beispiel auf die Gelenke beim Laufen ausgeübt wird, ist wichtig für die Entwicklung von Knorpel und, wie man heute weiß, auch für Knochen. In der kompliziertesten Variante sind die Reaktoren mit Biosensoren ausgestattet, die zum Beispiel den Sauerstoffverbrauch der Zellen messen und so wertvolle Informatio-

nen liefern. Viele Bayreuther Forschungsarbeiten auf diesem Gebiet sind aus dem Verbundprojekt „Individuelle Knochenregeneration mittels Tissue-Engineering (IK-TE)“ hervorgegangen, das vom Bundesministerium für Bildung und Forschung gefördert wurde.

DAS WACHSTUM VON KNORPELGEWEBE GEZIELT STIMULIEREN

Knorpelgewebe wird – ähnlich wie lebende Schwämme – in einem weichen Gerüst gezüchtet. Lässt sich dabei die Bildung von Knorpelzellen durch mechanische Stimulierung beeinflussen? Diese Frage haben Studierende der Universität Bayreuth in einer Reihe von Bachelorarbeiten untersucht. Nachdem zunächst gezeigt wurde, wie wichtig eine Druckbewegung für die Entwicklung der Zellen ist, konnte mit dem System ein neues Material getestet werden, das die Bildung von Knorpel hervorragend unterstützt. Infolge einer mechanischen Bewegung des Gerüstmaterials wird Flüssigkeit durch das Gewebe gedrückt. Dies entspricht der natürlichen Versorgung von Knorpel, der ja auch im menschlichen Körper keine Blutgefäße enthält und im Wesentlichen durch die Bewegung der Gelenke versorgt wird. Die Knorpelzellen nehmen den Druck, der von der Flüssigkeit ausgeht, wahr und reagieren mit der vermehrten Bildung einer Matrix. Darin können sich weitere Knorpelzellen schnell und wohlstrukturiert entwickeln.

Die Wechselwirkung der Knorpelzellen mit der Matrix lässt sich optimieren, indem man besonders geeignete Gerüststoffe wählt. Im Fokus der Arbeiten in der AG RegMed stehen Vielfachzucker (Polysaccharide). Sie sind als Biomaterialien besonders gut geeignet, weil sie keine Proteine



Abb. 6: Florian Gaudig, TA (li.), und Masterstudent Alexander Lubosch B.Sc. bereiten unter der sterilen Werkbank ein Bioreaktorsystem für den nächsten Einsatz vor (Foto: Christian Wißler).

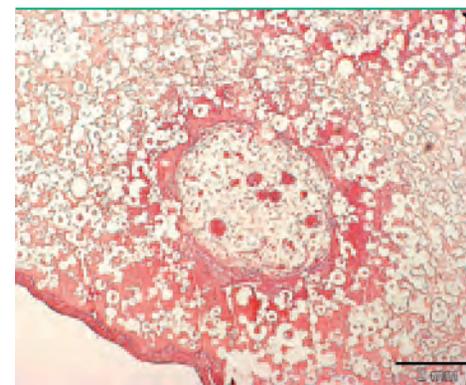
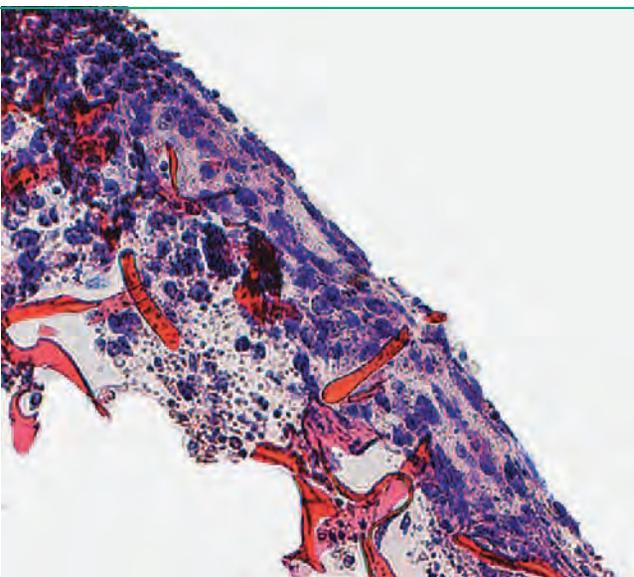
enthalten. Die Ausbildung einer Immunreaktion über Antikörper ist dadurch sehr unwahrscheinlich, die Übertragung von Krankheiten ist ausgeschlossen. Einem Team der AG RegMed ist es gelungen, Zellen der knorpelbildenden Zell-Linie ATDC5 innerhalb von nur 28 Tagen zu einer ausgeprägten Bildung von Knorpelmatrix anzuregen (Abb. 7). Dieser Erfolg ermutigt zu weiteren Forschungsarbeiten auf diesem Gebiet und ist auch ein Verdienst der Friedrich-Baur-Stiftung, die das Projekt in Zusammenarbeit mit der LMU München gefördert hat.

DAS LEID VON TIEREN VERRINGERN

Ein weiterer Förderer ist die Schweizer Stiftung AnimalFreeResearch, die das Projekt „InvitroBoneSpec“ unterstützt. Hierbei geht es um ein neuartiges, standardisiertes System für das Testen von Knochenersatzmaterialien. Viele Tierversuche in diesem Bereich werden sich damit künftig vermeiden lassen. In diesem System werden Knochen aufbauende (Osteoblasten) und Knochen abbauende Zellen (Osteoklasten) zuerst getrennt und dann zusammen in einem künstlichen Knochen system gezüchtet. In ihrem Zusammenspiel sind die Knochenzellen für den ständigen Umbau des menschlichen Skeletts – das *Bone Remodelling* – verantwortlich. Für die Kultivierung der Gewebe kommen die Bioreaktoren zum Einsatz. Hier kann man mit hoher Genauigkeit verfolgen, wie das jeweils getestete Material und die Zellen interagieren. So lässt sich beispielsweise auch feststellen, wie Blutgefäße in das Knochenersatzmaterial einwachsen (Abb. 8).

Abb. 7 (links): Innerhalb von 28 Tagen hat sich im Labor Knorpelgewebe in den neuen Gerüstschwämmchen (Scaffolds) aus Polysacchariden unter Druckstimulierung gebildet (Mikroskopische Aufnahme: Vanessa Strobel).

Abb. 8: Blutgefäße wachsen in die Porenkanäle eines gedruckten Knochenersatzmaterials ein und versorgen die Zellen ringsum (Mikroskopische Aufnahme: Universität Bayreuth).



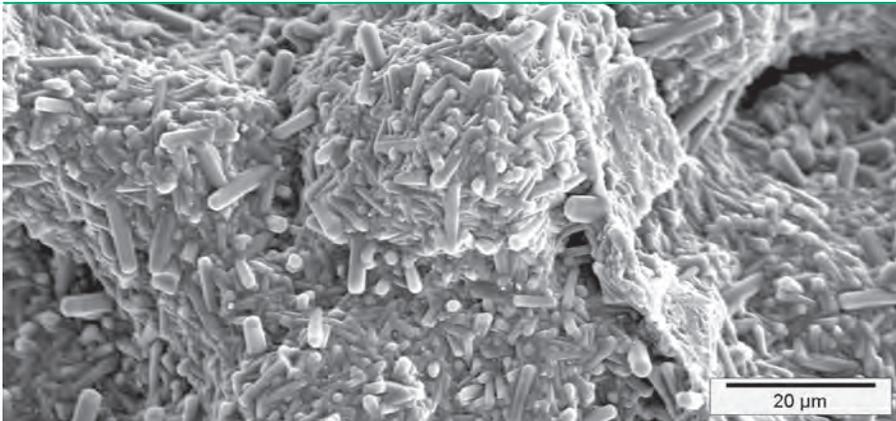


Abb. 9: Siliziumnitrid-Keramik hat eine für das Anwachsen von Zellen besonders geeignete Oberfläche (Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme: FCT Ingenieurkeramik).

Abb. 10: Solche Cages werden als Implantat zur Versteifung von Wirbeln eingesetzt, wenn die Bandscheibe nicht mehr zu retten ist (Foto: Orthobion GmbH).

Am Ende der Tests steht eine Vorauswahl von Materialien, die im Hinblick auf mögliche medizinische Anwendungen besonders attraktiv scheinen.

Damit diese Materialien eines Tages tatsächlich als Implantatwerkstoffe genutzt und Patienten eingepflanzt werden können, lassen sich Tierversuche nicht völlig vermeiden. Allerdings hilft das Testsystem, das Leid von Tieren zu verringern – und zwar in doppelter Hinsicht. Zu oft werden Knochenersatzmaterialien und Implantatwerkstoffe bereits in frühen Forschungsstadien im Tier getestet. Vor allem Versuche an Kleintieren (bis zum Kaninchen) und Beagle-Hunden sind hier kritisch zu sehen, da die Ergebnisse für den Einsatz im Menschen nicht einmal besonders relevant sind. Tests im Bioreaktor sind daher sowohl unter ethischen wie unter wissenschaftlichen Aspekten die bessere Alternative. Hinzu kommt, dass erfolgreich getestete Materialien mit großer Wahrscheinlichkeit gut einwachsen. So ersparen sie den Tieren komplizierte Heilungsprozesse.

GESUNDHEITSRISIKEN FÜR PATIENTEN SENKEN

Mit einer Weiterentwicklung dieses bereits sehr fortschrittlichen Tierversuchersatzsystem besafst sich das neueste Projekt der Bayreuther Forscher. Es wird von einem Forschungsverbund getragen. Die Leitung hat die Firma FCT Keramik (Rauenstein), weitere Mitglieder sind der Implantathersteller Orthobion in Konstanz, das Prüflabor Endolabs in Rosenheim sowie das Fraunhofer Institut IWM in Freiburg. Gemeinsam wollen die Partner Implantatwerkstoffe für den Rücken aus Siliziumnitrid-Keramiken entwickeln (Abb. 9). Diese Hochleistungskeramiken, die bisher vor allem in technischen Bereichen vom Automobilbau bis zur Raumfahrt eingesetzt werden, eignen sich grundsätzlich hervorragend als lasttragende Implantate. Wichtig ist, dass die Oberfläche der Keramiken gut

mit dem Knochen interagiert und zugleich das Bakterienwachstum hemmt.

Um diese Prozesse zu untersuchen, entwickelt die AG RegMed ein neues Bioreaktorsystem. Hier werden zunächst auf bekannten Referenzmaterialien Knochenzellkulturen etabliert, anschließend bringt man die Zellen in direkten Kontakt mit dem neuen Werkstoff. Nach einer gewissen Zeit wird geschaut, wie der Knochen an das Implantat angewachsen und wie weit er eingewachsen ist. Ein solches Verfahren für Tests im Labor existiert bisher nicht und ist daher eine Innovation, die über das Tierversuchersatzsystem hinausgeht.



Materialien, die für Implantate verwendet werden, sollten so beschaffen sein, dass das Risiko späterer Infektionen für die Patienten möglichst gering ist. Selbst wenn Implantate vor Operationen gründlich gereinigt und sterilisiert werden, kommen sie doch manchmal mit Bakterienzellen in Kontakt. Dass das Material diese Bakterien von sich aus abtötet, ist nicht zu erwarten, denn es soll ja keine Wirkstoffe freisetzen. Aber Implantatwerkstoffe können möglicherweise verhindern, dass sich an ihrer Oberfläche ein bakterieller Biofilm bildet. In dieser Hinsicht gibt es bereits vielversprechende Materialien. Für sie ist bisher kein geeigneter Test anerkannt, so dass sie trotz fortschrittlicher Eigenschaften nicht zugelassen werden. Vor diesem Hintergrund entwickelt die AG RegMed ein Testverfahren weiter, mit dem sich zuverlässig ermitteln lässt, wie gut potenzielle Implantatwerkstoffe imstande sind, eine Besiedlung mit Bakterien zu verhindern. Bei diesem Verfahren werden einerseits nur Bakterien, andererseits Bakterien und Säugerzellen gleichzeitig auf den Materialien dünn ausgesiedelt und kultiviert. Mit dem Rasterelektronenmikroskop wird dann untersucht, inwieweit das Material das Wachstum der Säugerzellen begünstigt und das der Bakterien hemmt. Die Bayreuther Wissenschaftler sind zuversichtlich, dass sie auf diesem Weg neue Implantatwerkstoffe identifizieren können, die mit keinen oder nur geringeren Infektionsrisiken verbunden sind. Insbesondere wollen sie die spezielle Eignung von Siliziumnitrid herausarbeiten und so dazu beitragen, dass Patienten künftig ein optimiertes Material für die Behandlung schwerer Bandscheibendefekte erhalten (Abb. 10).

„DIE BEIM 3D-DRUCK
VERWENDETEN
MATERIALIEN BESTEHEN
AUS DEM GLEICHEN
MINERAL WIE DER
KNOCHEN SELBST UND
KÖNNEN VOLLSTÄNDIG
ABGEBAUT WERDEN,
WENN NEU GEBILDETER
KNOCHEN SIE ERSETZT.“

Innovationen für die medizinische Praxis

Das Friedrich-Baur BioMed Center ist eine von der Friedrich-Baur-Stiftung getragene gemeinnützige GmbH, die Forschungsprojekte fördert, selbst mit durchführt und die Umsetzung von neuesten Forschungsergebnissen in die Anwendung vorantreibt. Es wurde 2012 von Daniel Seitz und Prof. Dr. Stefan Schuster gegründet. Im Vordergrund der Forschungs- und Entwicklungsarbeiten steht die verbesserte Versorgung von Patienten, nicht die kommerzielle Verwertung. Weitere Ziele sind die Aufklärung und Information der Öffentlichkeit und die Unterstützung der Lehre an der Universität Bayreuth.

Das FB BioMed Center vereint Labore aus der Material- und Verfahrenswissenschaft sowie der Biologie unter einem Dach. Auf dem Gebiet der biologischen Forschung kooperiert es in zahlreichen Projekten mit dem Lehrstuhl für Tierphysiologie. Mit seinen Anwendungskompetenzen schlägt es Brücken zwischen Wissenschaft und Praxis und unterhält dabei ein breites regionales, nationales und internationales Netzwerk mit kooperierenden Medizinern. So bildet das FB BioMed Center eine Plattform für anwendungsnahe Entwicklungsarbeiten im Bereich der Medizin und Medizintechnik direkt in Oberfranken.

In einem Kompetenzzentrum für Rapid Prototyping wird an der biologisch und medizinisch korrekten Umwandlung von Bilddaten von Patienten gearbeitet – der Weg führt dabei beispielsweise von einer Computertomografie über virtuelle Modelle zum Ausdruck im 3D-Drucker. So werden aus einem Material, das auf Gips und Kunststoffen basiert, individuelle Knochenmodelle hergestellt. Damit können Ärzte Operationen so vorbereiten und durchführen, als ob es sich um einen echten Knochen handeln würde. Diese Boneplan® Modelle werden zum Beispiel in internationalen Schulungen am renommierten Krankenhaus BGU Murnau verwendet. Vor allem aber unterstützt die gGmbH damit frühkindliche Operationen am Katholischen Kinderkrankenhaus Wilhelmsstift in Hamburg. Wenn zu früh zusammengewachsene Schädelknochen im Alter von 10 Monaten operativ wieder getrennt werden müssen, ist ein Modell wichtig um die Operationsstrategie zu planen und somit den Eingriff wesentlich kürzer und sicherer zu machen. Auch neue, verbesserte Techniken wurden anhand von Modell-OPs entwickelt. Damit tritt die gezielte Planung und Vorbereitung an die Stelle eines improvisierten Handelns im OP. Sie entlastet die Ärzte und erhöht die Sicherheit der Patienten.

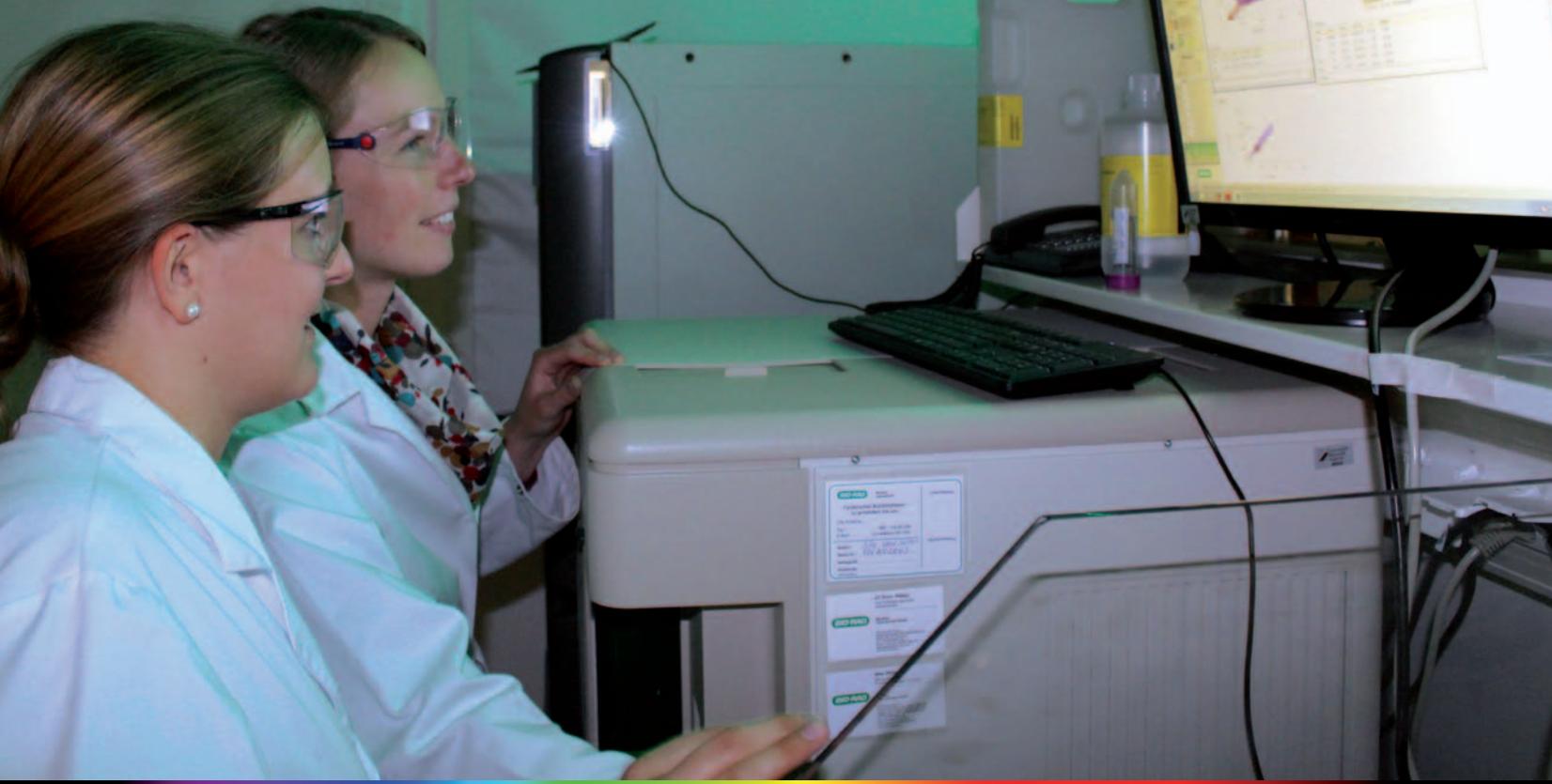
Geht man einen Schritt weiter und verwendet im 3D Drucker das mineralische Material, aus dem die Knochen des Körpers selber bestehen, so erhält man im Drucker hergestellte Knochen. Das FB BioMed Center kann ganze Knochenstücke, die etwa nach einer Tumorentfernung fehlen, am Computer modellieren und dann mit inneren Porenkanälen ausdrucken, in die der Knochen samt Blutgefäßen einwachsen kann. Die biologische Eignung wird dabei im Zelllabor des FB BioMed Center mit dem InvitroBoneSpec-System zuverlässig getestet.



Abb. 1 (links): Daniel Seitz, Geschäftsführer der FB BioMed Center gGmbH, vergleicht ein Schädelmodell für die Vorbereitung einer OP wegen frühzeitiger Nahtverknöcherung mit Exemplaren aus dem Archiv. Die Aufbereitung der Daten erfolgt unter sorgfältiger Berücksichtigung der anatomischen Gegebenheiten (Foto: Christian Wißler).



Abb. 2 (rechts): Ein frisch gedrucktes Testblöckchen von Knochenersatzmaterial wird aus dem Pulverbett genommen. Es hat bis zum fertigen Implantatwerkstoff noch einige Arbeitsschritte vor sich (Foto: Christian Wißler). Dieses 3D gedruckte Knochenersatzmaterial bringt zudem besondere Eigenschaften mit, denn nicht nur die biologische Eignung und der vollständige Abbau im Körper nach Ersatz durch neu gebildeten Knochen sind optimiert. Sehr wichtig für die Eignung zur Anwendung ist auch die Möglichkeit, Schrauben direkt in das Implantat an beliebiger Stelle setzen zu können bei guter mechanischer Stabilität. Das Skelett des Menschen besteht nicht einfach nur aus „Knochen“, dieser ist an jeder Stelle anders, an seine spezielle Funktion angepasst und individuell. Das Friedrich-Baur BioMed Center hat hierzu den individuell druckbaren Knochenersatz entwickelt.



■ JENNIFER NACK
ANDREAS MÖGLICH

Optogenetik: Licht revolutioniert die Biologie

PHOTOREZEPTOREN ERMÖGLICHEN INNOVATIVE ANWENDUNGEN
IN DEN LEBENSWISSENSCHAFTEN

■ Zellen werden anhand ihrer Fluoreszenz charakterisiert und sortiert. (Foto: Christian Wißler).

Dass Licht einen großen Einfluss auf biologische Prozesse hat, ist seit Jahrhunderten bekannt. Licht dient als Energiequelle für die Photosynthese und ist für photosynthetisch aktive Organismen – vor allem Pflanzen, Algen und einige Bakterien – überlebenswichtig. Licht transportiert aber nicht nur Energie, sondern auch räumliche und zeitliche Informationen, die von Organismen genutzt werden können. So ist einer der am besten dokumentierten Einflüsse von Licht auf Pflanzen der Phototropismus, das Wachstum hin zum Licht. Allerdings sind hohe Lichtintensitäten für viele Lebewesen schädlich. Diese entwickeln daher sensorische Systeme, um derart ungünstige Lebensbedingungen zu erkennen und möglichst zu vermeiden.

Diese Beispiele stehen stellvertretend für eine Vielzahl lichtabhängiger Anpassungen, die sich in der Natur beobachten lassen. Sie werden durch Photorezeptoren in den Lebewesen vermittelt. Hierbei handelt es sich um Proteine, die mittels eines Farbstoffmoleküls Licht verschiedener Wellenlängen erkennen und daraufhin biologische Effekte auslösen. Bedingt durch die Vielseitigkeit der Organismen, die sich solcher Rezeptoren bedienen, kommen diese in großer Zahl und Diversität vor. Tatsächlich werden das gesamte Spektrum des sichtbaren Lichts sowie die Nah-UV- und Nah-Infrarot-Bereiche von verschiedenen Photorezeptoren abgedeckt.

EIN NEUES FORSCHUNGSFELD: DIE OPTOGENETIK

Während photosensorische Prozesse bereits seit Jahrzehnten erforscht werden, kommen Photorezeptoren seit ungefähr 15 Jahren in der Neuro- und Molekularbiologie mit beeindruckenden Ergebnissen zum Einsatz: ein Forschungsfeld, das als Optogenetik bezeichnet wird. Grundgedanke der Optogenetik ist es, durch die Bestrahlung mit Licht definierte Effekte in lebenden Zellen oder auch in ganzen Organismen auszulösen. So kann man mittels geeigneter Photorezeptoren bestimmte Gene ein- und ausschalten, um deren Funktionen und Auswirkungen auf den Organismus zu erforschen. Auch die Rolle von Signalmolekülen lässt sich im Labor mit hoher Genauigkeit bestimmen, wenn durch ein Lichtsignal die Ausschüttung dieser Botenstoffe ausgelöst wird.

Herkömmliche Ansätze zum Studium biologischer Prozesse haben oft Nachteile: Sie erfordern meist die Verwendung von Chemikalien oder physischen Reizen, die sich mitunter schwierig kontrollieren lassen und häufig zellschädigend wirken. In manchen Fällen ist es sogar nötig, die zu untersuchenden biologischen Systeme vorher zu fixieren und damit abzutöten. Wenn hingegen in der optogenetischen Forschung Lichtsignale eingesetzt werden, so hat dies den Vorteil, dass das Licht lebendes Gewebe bis zu einer gewissen Tiefe durchdringt und räumlich sowie zeitlich kontrollierbar ist. Infolgedessen ist es möglich, eine Vielzahl von Zusammenhängen zu untersuchen, ohne den Organismus dabei zu schädigen. So kann mithilfe optogenetischer Methoden zum Beispiel beobachtet werden, wie einzelne Neuronen im Gehirn auf Lichtreize reagieren. Photorezeptoren haben außerdem den Vorteil, dass sie reversibel aktiviert werden können: Sie kehren nach Lichtbestrahlung wieder in ihren Ausgangszustand zurück und besitzen keine Signalwirkung mehr. Dadurch lassen sich negative Effekte, wie sie etwa durch eine dauerhafte Ausschüttung von Botenstoffen ausgelöst würden, verhindern.

BAUSTEINE FÜR NEUE PHOTOREZEPTOREN

Genauere Erkenntnisse über molekulare Strukturen und Funktionen natürlicher Photorezeptoren versetzen die Forschung in die Lage, veränderte oder sogar ganz neue Rezeptoren zu entwickeln. Erleichtert wird der Bau künstlicher Photorezeptoren durch ihren modularen Aufbau. Sie bestehen nämlich aus unterschiedlichen Proteinstrukturen, die als Domänen bezeichnet werden:



Abb. 1: Masterstudentin Julia Henne-
mann reguliert die Lichtintensität für
die Kultivierung von Bakterien (Foto: Christian
Wißler).

AUTOREN



Prof. Dr. Andreas Möglich ist
Professor für Biochemie an der
Universität Bayreuth.



Jennifer Nack M.Sc. ist Doktoran-
dantin und wissenschaftliche
Mitarbeiterin am Lehrstuhl für
Biochemie. Zudem ist sie Mitglied
der University of Bayreuth Graduate
School.

Abb. 2: Vor dem Experiment wird das dabei verwendete Protein gereinigt und aufkonzentriert. Im Labor: Doktorand David Golonka M.Sc. (Foto: Christian Wißler).



- Die Sensordomäne ist für die Lichtabsorption und Weiterleitung des Lichtsignals zuständig.
- Die Effektordomäne löst in der Zelle eine physiologische Antwort aus, beispielsweise die eingangs beschriebenen Anpassungsleistungen des Organismus an die jeweiligen Lichtverhältnisse.

Die räumliche Trennung dieser ‚Bausteine‘ ermöglicht es, sie im Labor durch andere Proteinstrukturen auszutauschen. Wird die Sensordomäne durch eine andere ersetzt, ist es beispielsweise möglich, die physiologische Antwort durch Lichtsignale anderer Wellenlängen zu erzeugen. Wird hingegen die Effektordomäne ausgetauscht, können durch Lichtsignale ganz andere physiologische Prozesse gesteuert werden – sogar solche Prozesse, die in der Natur überhaupt nicht von Lichtsignalen abhängen. Die im Labor erzeugten, künstlichen Photorezeptoren erweitern daher den Anwendungsbereich der Optogenetik beträchtlich.

EIN NEUES MOLEKÜL ZUR STEUERUNG DER GENEXPRESSION

Ein Beispiel ist ein Photorezeptor, den die Forschungsgruppe unter der Leitung von Prof. Andreas Möglich neu konzipiert hat. Das Signalprotein YF1 wurde im Labor aus Komponenten zusammengesetzt, die zuvor den Proteinen verschiedener Bakterienarten entnommen worden waren: Die blaulichtempfindliche Sensordomäne stammt aus dem Protein YtvA von *Bacillus subtilis*, die Effektordomäne aus dem Protein FixL von *Bradyrhizobium japonicum* (Abb. 3).¹ Das daraus gebildete YF1-Protein erlaubt es nun, in bakteriellen Systemen die Expression von Genen lichtabhängig zu steuern: Die Bestrahlung mit Blaulicht führt zur Produktion von Proteinen.

Röntgenkristallographische Untersuchungen förderten ein detailliertes atomares Bild der Struktur

von YF1 zutage. Zusammen mit biochemischen Experimenten führten sie zu dem Ergebnis: Die Länge der ‚Brücke‘, welche die Sensor- und die Effektordomäne in diesem Signalmolekül verbindet, hat einen ganz entscheidenden Einfluss darauf, in welcher Weise die Proteine auf Licht reagieren. Diese Erkenntnisse lassen sich auch auf andere Rezeptoren übertragen.

„DIE IM LABOR ERZEUGTEN, KÜNSTLICHEN PHOTOREZEPTOREN ERWEITERN DEN ANWENDUNGSBEREICH DER OPTOGENETIK BETRÄCHTLICH.“

Um den Einsatz des Signalmoleküls in Forschung und Biotechnologie zu erleichtern, hat die Bayreuther Arbeitsgruppe ein System entwickelt, das es auf einfache Weise ermöglicht, durch Bestrahlung mit Blaulicht die jeweils gewünschten Proteine herzustellen. Die Systeme zur lichtregulierten Genexpression erfreuen sich nicht allein bei Studierenden im Rahmen von Praktika großer Beliebtheit. In den knapp fünf Jahren seit der entsprechenden Veröffentlichung wurden sie weltweit an rund 100 Forscher weitergegeben.

EIN NEUARTIGES WERKZEUG ZUR BEEINFLUSSUNG DES STOFFWECHSELS

Ein weiteres Beispiel für die Forschungsarbeiten der Bayreuther Optogenetik ist das Design durch Rotlicht aktivierter Enzyme, die für Stoffwechselprozesse in Bakterien, Tieren und Menschen eine wesentliche Rolle spielen. Die rotlichtaktivierte Phosphodiesterase LAPD ist ein neuartiges optogenetisches Werkzeug, das es möglich macht, in-

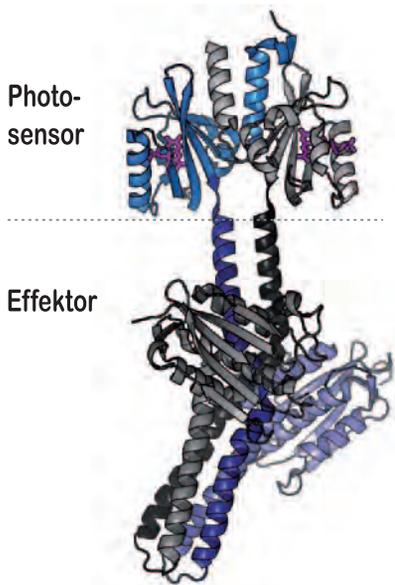


Abb. 3: Der Photorezeptor YF1 wurde im Labor aus einem Sensor- und Effektor teil zusammengesetzt. Die blaulicht-empfindlichen Chromophore sind in pink hervorgehoben (Bild: Arbeitsgruppe Prof. Andreas Möglich).

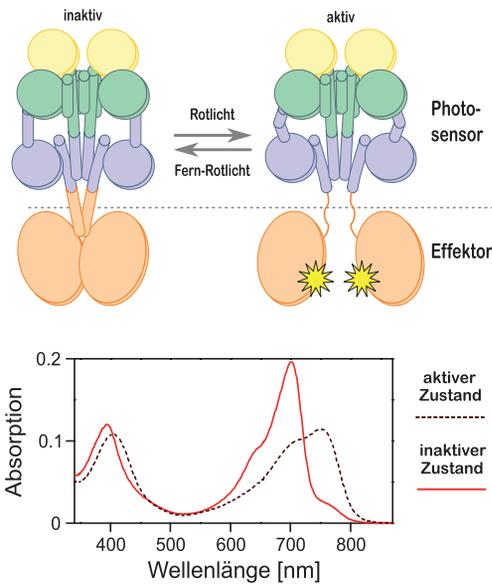


Abb 4: Die künstlich erzeugte Phosphodiesterase LAPD vermittelt den Abbau wichtiger biologischer Botenstoffe. Die Absorption von Rotlicht löst weitreichende Strukturveränderungen aus, die eine erhöhte enzymatische Aktivität bewirken. Durch Bestrahlung mit Licht im Fern-Rot Bereich kann das Protein wieder inaktiviert werden. Auch im Absorptionsspektrum sind die Unterschiede zwischen aktivem und inaktivem Zustand zu erkennen (Bild: Arbeitsgruppe Prof. Andreas Möglich).

ZUKUNFTSPERSPEKTIVEN

Die vielfältigen Forschungsprojekte an der Universität Bayreuth auf dem Gebiet der Optogenetik verfolgen das gemeinsame Ziel, die molekularen Mechanismen der Aktivierung verschiedener Photorezeptoren zu verstehen und universelle Prinzipien zu identifizieren. Hierfür werden die Aktivität sowie die Strukturzusammenhänge von Modellproteinen mit modernsten Forschungstechnologien untersucht. Bei der Suche nach neuartigen Photorezeptoren kommen auch bioinformatische Verfahren zur Anwendung, die für die Analyse großer anfallender Datenmengen unverzichtbar sind.

nerhalb der Zelle die Konzentration bestimmter Botenstoffe zu steuern – beispielsweise des Signalmoleküls cAMP, das den Energiestoffwechsel beeinflusst (Abb. 4).² Während in Bayreuth hauptsächlich an bakteriellen Systemen gearbeitet wird, wurde LAPD inzwischen auch in eukaryotischen Zellkulturen und Zebrafischen erfolgreich eingesetzt.

In einem anderen Projekt gelang es der Arbeitsgruppe um Prof. Andreas Möglich, Varianten der DNA-Endonuclease Cas9 herzustellen, die sich durch Licht und Temperatur steuern lassen. Auf diese Weise können beliebige Gene in Bakterien durch Licht und Temperatur geschaltet werden.³

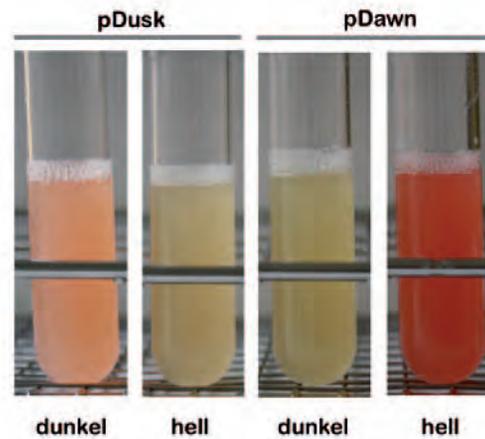
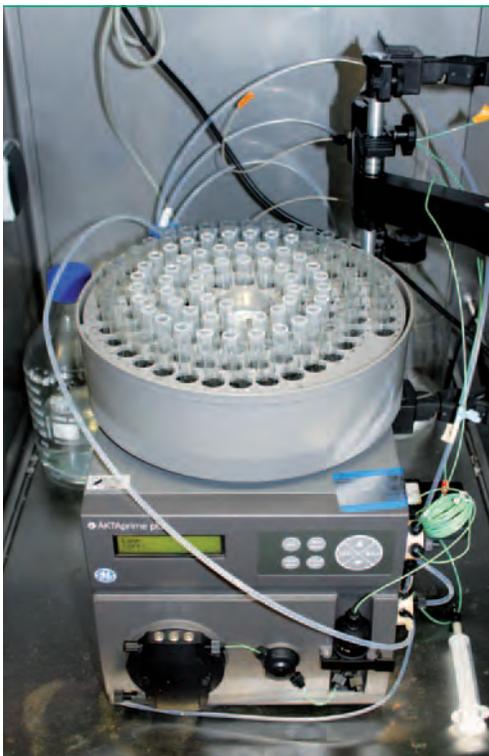


Abb 5: Das optogenetische System pDusk und das daraus abgeleitete pDawn vermitteln Lichtkontrolle über die Produktion beliebiger Proteine in bakteriellen Zellen. Wie hier beispielhaft für ein rot fluoreszierendes Protein gezeigt, sind die Unterschiede in der Produktion mit bloßem Auge erkennbar (Bild: Arbeitsgruppe Prof. Andreas Möglich).



Die aus diesen Forschungsarbeiten resultierenden Erkenntnisse tragen langfristig dazu bei, vielfältig einsetzbare Photorezeptoren zu entwickeln. Diese sollen in Zukunft nicht nur in Bakterien, sondern auch in tierischen Zellen und verstärkt in ganzen Organismen verwendet werden. Vor allem im Bereich der Neurowissenschaften wird der Einsatz von Photorezeptoren schon heute wegen der überlegenen räumlichen und zeitlichen Auflösung geschätzt. Aber auch in anderen Bereichen der biologischen Forschung, insbesondere der Zellbiologie, bewähren sich die vielseitigen Proteine. Die rasant fortschreitende Entwicklung neuer optogenetischer Werkzeuge, seit Sommer 2015 auch an der Universität Bayreuth, verspricht für die Zukunft zahlreiche innovative Anwendungsmöglichkeiten.

- 1 A. Möglich et al.: Design and signaling mechanism of light-regulated histidine kinases, in: Journal of molecular biology (2009), Vol. 385, Issue 5, pp. 1433–1444, doi: 10.1016/j.jmb.2008.12.017.
- 2 C. Gasser et al.: Engineering of a red-light-activated human cAMP/cGMP-specific phosphodiesterase, in: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Vol. 111, No. 24, pp 8803–8808, doi: 10.1073/pnas.1321600111.
- 3 F. Richter et al.: Engineering of temperature- and light-switchable Cas9 variants, in: Nucleic Acids Research (2016), doi: 10.1093/nar/gkw930.

Abb 6: Gerät zur Proteinreinigung (Foto: Christian Wißler).



■ ELISA BOMBARDA

Biochemische Physik

MIT PHYSIK UND CHEMIE DEN MOLEKÜLEN DES LEBENS AUF DER SPUR

■ Oxana Kempf, Doktorandin und Mitglied der Arbeitsgruppe Biomolekulare Kinetik an der Universität Bayreuth, bereitet ein Experiment an einer Stopped-Flow Apparatur vor, um die Kinetik einer chemischen Reaktion spektroskopisch zu verfolgen (Foto: Norbert Achtelik).

„Mit Sicherheit macht im Augenblick kein Wissenschaftsgebiet an so vielen Fronten mehr Fortschritte als die Biologie, und wenn wir eine der erfolgreichsten Annahmen nennen sollen, die mehr und mehr hilft, das Leben zu verstehen, so ist es die, dass alle Dinge aus Atomen bestehen und dass alles, was lebende Dinge tun können, durch das Rütteln und Wackeln von Atomen erklärt werden kann.“¹ Dies sagte schon vor mehr als 50 Jahren der Physik-Nobelpreisträger Richard Feynman in seinen berühmten Vorlesungen zur Physik. Immer noch ist dieser Satz gültig, heute vielleicht sogar mehr als damals. Jetzt beginnen wir zu verstehen, wie sich – bestimmt durch die Gesetze der Physik – Atome zu den Molekülen und Aggregaten zusammenfügen, die in einem faszinierenden Zusammenspiel die Vielzahl von Lebensprozessen hervorbringen.

VOM MOLEKÜL ZUM BIOCHEMISCHEN PROZESS

Während Nukleinsäuren wie DNA und RNA die Träger der biologischen Information sind, setzen Proteine diese Information in biochemische Prozesse um und führen die verschiedensten Aufgaben durch: Sie geben Zellen und Organismen Form; sie helfen den Organismen, die unterschiedlichsten Bewegungen auszuführen; sie transformieren unterschiedliche Energieformen in biologisch verwertbare Energie; und sie arbeiten als Katalysatoren im Stoffwechsel und bei der Biosynthese fast aller biologischer Substanzen. Um zu verstehen, wie ein Protein all diese verschiedenen Aufgaben ausführen kann, setzt die Forschung ein breites Spektrum unterschiedlicher Technologien und Verfahren ein. Interdisziplinäre Kooperationen sind dabei für den Forschungserfolg oftmals entscheidend. Ein Beispiel hierfür ist der Verlauf eines Projektes aus der Arbeitsgruppe **Biomolekulare Kinetik**, das von der DFG gefördert wurde, aber noch nicht abgeschlossen ist.

Im Mittelpunkt des Projekts steht ein spezielles Enzym. Enzyme sind Proteine und fungieren im Organismus als Katalysatoren. Wie alle Katalysatoren arbeiten sie in einem Zyklus. Zunächst bindet ein umzusetzendes Molekül, das Substrat, an das Enzym. Dieses Substrat wird dann meist in mehreren Schritten über verschiedene Zwischenprodukte (Intermediate) chemisch verändert. Schließlich trennt sich das Enzym vom Reaktionsprodukt, und der Zyklus kann von neuem beginnen (Abb. 1).

Das Enzym, das im Rahmen des Projektes untersucht wird, ist die Phytochelatin-Synthase (PCS), die zur großen Familie der Peptidasen gehört. Dies sind Proteine, die die Peptidbindungen anderer Proteine spalten. PCS hat jedoch nicht nur die Fähigkeit, Peptidbindungen zu spalten, sondern ist auch imstande, neue Bindungen zu knüpfen. Diese sogenannte Transpeptidase-Aktivität macht PCS für die Biotechnologie und Biomedizin hochinteressant, weil sie grundsätzlich die Möglichkeit bietet, Enzyme für die Herstellung von Peptiden einzusetzen. Die Funktionsweise von PCS auf molekularer Ebene detailliert zu verstehen, war daher von vornherein das Ziel des Projekts. Gerade in der Anfangsphase bewährte sich dabei die interdisziplinäre Zusammenarbeit auf dem Bayreuther Campus:

- Prof. Stephan Clemens vom Lehrstuhl für **Pflanzenphysiologie** stellte der Arbeitsgruppe das Gen zur Verfügung, das man für die Herstellung des Proteins PCS benötigt.
- Bei der biotechnologischen Herstellung von PCS, der Expression, leistete Prof. Wulf Blankenfeldt vom Lehrstuhl für **Biochemie** wertvolle Unterstützung. Seine Forschungsgruppe stellte überdies neue Kristallstrukturen zur Verfügung (Abb. 2), die detaillierte Erkenntnisse über die Wechselwirkungen zwischen PCS und seinem Substrat ermöglichten.
- Die chemischen Prozesse, die an dem Zyklus von PCS beteiligt sind, sind in ihrer raschen Abfolge von einer starken Dynamik geprägt. Einen ersten Eindruck davon lieferten enzymkinetische Analyseverfahren, die mit Hilfe der magnetischen Kernresonanzspektroskopie (NMR) angewendet wurden. Hier war die Expertise der Arbeitsgruppe von Prof. Paul Rösch am Lehrstuhl für **Biopolymere** von großem Nutzen.

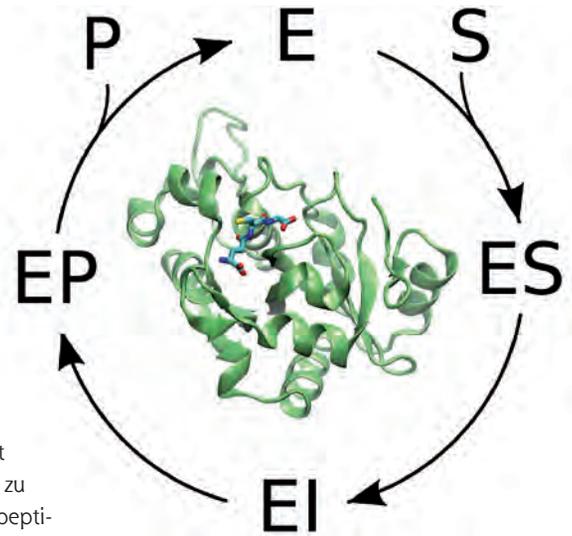
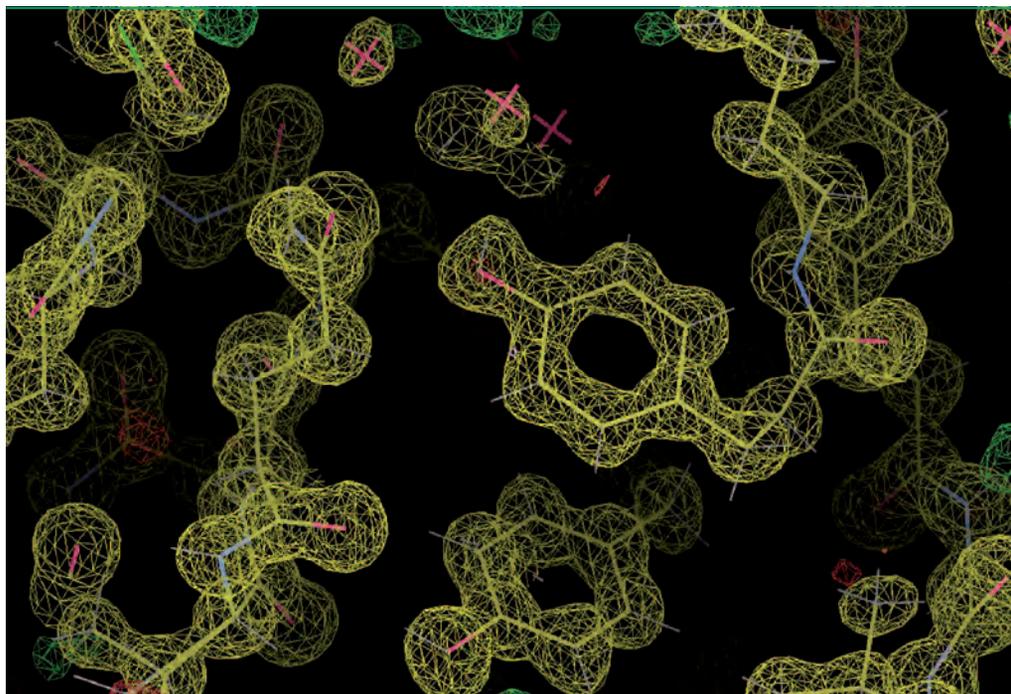


Abb. 1: Schematische Darstellung eines enzymatischen katalytischen Zyklus. Ein Substratmolekül (S) bindet an ein Enzym (E) und bildet einen Enzym-Substrat-Komplex (ES). Das Enzym modifiziert das Substrat meist über einen oder mehrere Intermediate (I) zum Produkt (P), das schließlich vom Enzym dissoziiert. Das Enzym ist dann frei für einen neuen katalytischen Zyklus (Grafik: Elisa Bombarda).

„DIE MODERNEN BIOWISSENSCHAFTEN SIND INTERDISZIPLINÄR.“

Doch so wichtig diese enzymkinetischen Einsichten auch waren, sie erlaubten keine detaillierte mechanistische Interpretation biochemischer Prozesse. An diesem Punkt war es die Fluoreszenzspektroskopie, die Fortschritte in diese Richtung

Abb. 2: Ausschnitt aus der Kristallstruktur des Enzyms Phytochelatin-Synthase mit einer Auflösung von 0,95 Angstrom. Die hohe Auflösung der Struktur erlaubt es, individuelle Atome im Molekül zu identifizieren (Aufnahme: Dr. Elisa Bombarda).



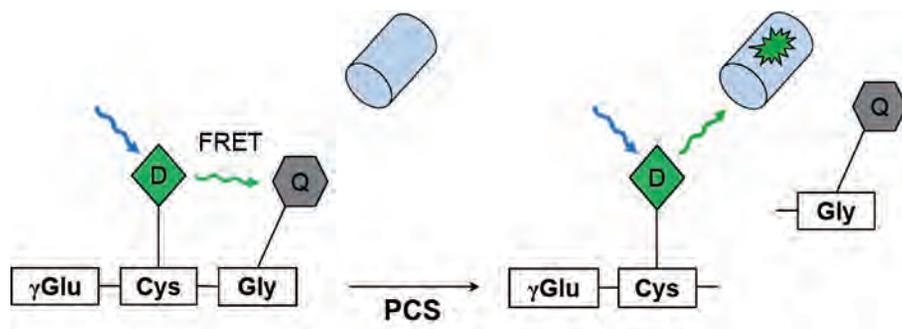
AUTORIN



Dr. Elisa Bombarda ist Gruppenleiterin der Arbeitsgruppe Biomolekulare Kinetik und zur Zeit Mitglied in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Andreas Möglich (Biochemie).

ermöglichen sollte. Allerdings macht es diese Technologie erforderlich, die zu analysierenden Moleküle chemisch zu modifizieren. So wurde auch das Molekül, das durch PCS gespalten wird, mit zwei Farbstoffen markiert, um es fluoreszenzspektroskopisch zu untersuchen. Ein FRET-basiertes Experiment sollte genaueren Aufschluss über das Verhalten dieses Moleküls geben (Abb. 3). Doch das Experiment führte zunächst nicht zu den erwarteten Erkenntnissen. Bei der Suche nach der Ursache halfen erneut enzymkinetische Untersuchungen mittels NMR. Es stellte sich heraus, dass die farbliche Markierung des Moleküls eine dramatische Verlangsamung der chemischen Reaktion bewirkt hatte.

Abb. 3: FRET-basierte Strategie zum Verfolgen der enzymatischen Reaktion von Phytochelatin-Synthase (PCS) (Grafik: Elisa Bombarda).



dass die Löslichkeit dieses Farbstoffs verbessert werden müsse, was durch chemische Modifikationen erreicht werden konnte. Der neu synthetisierte Farbstoff erhielt den Namen Hydrodabcyll (Abb. 4). Bei diesen Arbeiten bewährte sich der enge Kontakt zur Forschungsgruppe von Prof. Rai-

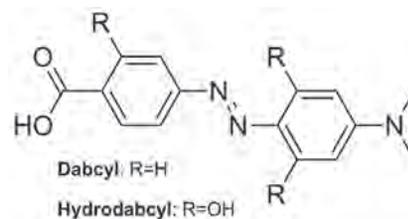


Abb. 4: Fluoreszenzquench-Farbstoffe Dabcyll und die neue Modifikation Hydrodabcyll. Die eingeführten Modifikationen verbessern die Wasserlöslichkeit des Farbstoffs, was gerade für biologische Anwendungen von großer Wichtigkeit ist.

ner Schobert am Lehrstuhl für **Organische Chemie**. Weitere Untersuchungen ergaben, dass der modifizierte Farbstoff Hydrodabcyll tatsächlich in der Lage ist, Dabcyll in vielerlei Hinsicht zu ersetzen. Er stellt mithin eine sehr attraktive Alternative zu diesem häufig verwendeten Farbstoff dar. Deshalb hat die Bayreuther Forschungsgruppe die Synthese und die Anwendung von Hydrodabcyll zum Patent angemeldet, das im Sommer 2016 of-

fengelegt wurde.² Seither wird der neue Farbstoff mit Erfolg für FRET-basierte Experimente eingesetzt, die nicht länger durch eine Verlangsamung der chemischen Reaktion beeinträchtigt werden. Sie fördern schrittweise neue Erkenntnisse über den Mechanismus des Enzyms PCS zutage.

Neben den experimentellen Untersuchungen werden auch eine Reihe von theoretischen Untersuchungen durchgeführt. Hierbei besteht eine enge Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Prof. Matthias Ullmann auf dem Gebiet der **Computer-gestützten Biochemie**. Elektrostatische Berechnungen und Simulationen sowie eine Kombination quantenchemischer und molekularmechanischer Modelle machen es möglich, biochemische Prozesse auf unterschiedlichen Zeit- und Größenskalen zu beschreiben und nachzustellen.³ Die Untersuchungen zum Enzym PCS sind noch nicht abgeschlossen und halten sicherlich noch weitere Überraschungen bereit. Am bisherigen Verlauf dieses Projekts lässt sich aber bereits ablesen, wie facettenreich und zugleich herausfordernd Untersuchungen sind, die Licht in das Wechselspiel von Struktur und Funktion der Biomoleküle bringen wollen.

PHYSIK ALLEIN IST NICHT GENUG

Die Biophysik ist ein weites Gebiet, das zwischen den traditionellen Wissenschaftsdisziplinen angesiedelt ist. Die Fragestellungen sind biologisch motiviert. Ziel ist es, die häufig sehr komplex scheinenden biologischen und biochemischen Prozesse durch einfache physikalische Prinzipien zu erklären. Oft ist der Weg zu diesen Erklärungen nicht direkt und bedarf der Wechselwirkung nicht nur mit der Biologie, sondern auch und gerade mit der Chemie und Informatik. Die modernen Biowissenschaften sind interdisziplinär. Dabei sollte man unter Interdisziplinarität nicht nur die Kooperation mit Wissenschaftlern aus anderen Disziplinen verstehen, auf deren Expertise man sich verlassen kann. Vielmehr ist es notwendig, sich selbst eine Expertise in den Nachbardisziplinen aufzubauen, um Stärken und Schwächen der verschiedenen Methoden besser einschätzen zu können und kreativ neue Zugänge zu ungelösten Fragestellungen zu entwickeln. Dieses Ziel kann man langfristig nur erreichen, wenn man das Denken in Schubkästen aufgibt, dass trotz gegenteiliger Bekundungen oft noch in den Köpfen verankert ist.

- 1 "Certainly no subject or field is making more progress on so many fronts at the present moment than biology, and if we were to name the most powerful assumption of all, which leads one on and on in an attempt to understand life, it is that all things are made of atoms, and that everything that living things do can be understood in terms of the jiggings and wiggings of atoms." Richard Feynman, The Feynman Lectures on Physics, 1964
- 2 Oxana Kempf, Karl Kempf, Rainer Schobert, G. Matthias Ullmann, and Elisa Bombarda: Hydrodabcyll. Internationale Patentanmeldung PCT/EP2015/077982; WO 2016/083611, Veröffentlichungstag: 02.06.2016.
- 3 G. Matthias Ullmann and Elisa Bombarda: pKa values and redox potentials of proteins. What do they mean? Biol. Chem., 394: 611-619, 2013. – G. Matthias Ullmann et al.: Theoretical Analysis of Electron Transfer in Proteins: From Simple Proteins to Complex Machineries. In Advances in Photosynthesis and Respiration Vol. 41: Cytochromes and Cytochrome Complexes: Structure and Function. (William A. Cramer and Toivo Kallas eds), Springer Verlag, pp.99-127, 2016.

Der Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET)

Eine besonders wichtige experimentelle Technik, die Auskünfte über die Zustände von Molekülen geben kann, ist die optische Spektroskopie, zum Beispiel die Fluoreszenzspektroskopie. Ein interessantes Phänomen in diesem Zusammenhang ist der Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET). Er wird nach dem Wissenschaftler Wilhelm Förster (1832 – 1921), der für dieses Phänomen erstmals eine mathematische Beschreibung lieferte, auch Förster-Resonance-Energietransfer bezeichnet. Beim FRET erfolgt eine Energieübertragung zwischen zwei Licht absorbierenden Molekülen, den Chromophoren (Abb. 5). Dabei überträgt ein Donor-Chromophor seinen elektronisch angeregten Zustand auf ein Akzeptor-Chromophor. Dieser Energietransfer geschieht strahlungsfrei und nicht durch Fluoreszenz.

Ob zwei Chromophore ein Donor-Akzeptor-Paar bilden können, hängt davon ab, inwieweit sich ihre Emissionsspektren überlappen. Die Effizienz der Energieübertragung ist umgekehrt proportional zur sechsten Potenz des Abstands zwischen Donor und Akzeptor. Dadurch ist FRET extrem empfindlich gegenüber relativ kleinen Abstandsänderungen. FRET führt zu einer Abnahme der Fluoreszenzintensität und Lebensdauer des Donors, und, wenn der Akzeptor fluoreszierend ist, erhöht FRET die Fluoreszenz des Akzeptors. Aus der Möglichkeit, Abstände zu messen, ergeben sich viele Anwendungsmöglichkeiten. Zum Beispiel kann FRET in lebenden Zellen eingesetzt werden, um Proteine zu lokalisieren oder Wechselwirkungen zwischen Proteinen und zellulären Strukturen aufzuklären. Ein weiteres Beispiel ist die Vielzahl neuer chemischer Sensoren und Biosensoren, die auf der Basis des FRET entwickelt wurden.

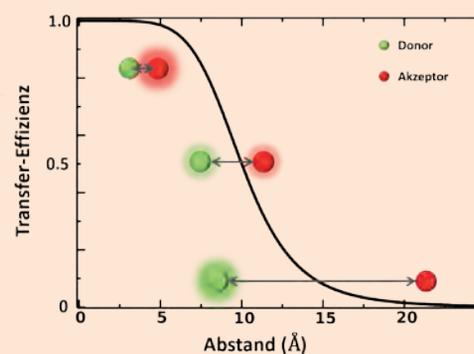
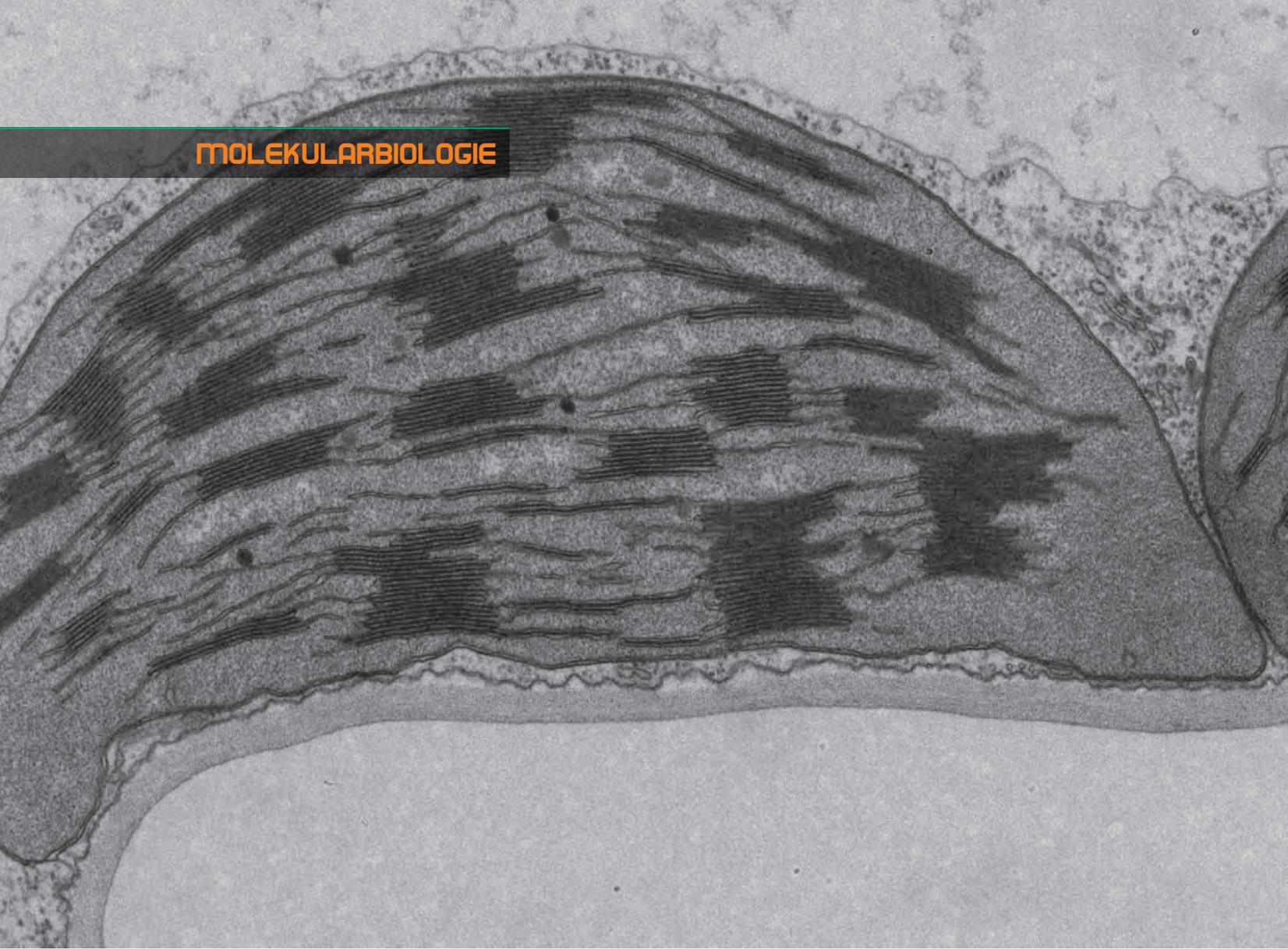


Abb. 5: Abstandsabhängigkeit der Energietransfereffizienz eines grünen Fluoreszenzdonors auf einen roten Fluoreszenzakzeptor (Förster-Radius 10 Å). Wenn beide Moleküle sehr nah beieinander sind, sieht man nur die Fluoreszenz des roten Akzeptors. Je weiter sich die beiden Moleküle voneinander entfernen, desto schwächer wird die Fluoreszenz des Akzeptors und desto intensiver wird die Fluoreszenz des Donors (Grafik: Elisa Bombarda).



■ BENEDIKT WESTERMANN
STEFAN GEIMER

Elektronenmikroskopie

EINBLICKE IN DIE NANOWELT DER ZELLEN

■ Chloroplasten sind die Zellorganellen, die in pflanzlichen Geweben aus Sonnenlicht Stoffwechselenergie erzeugen. Im Transmissionselektronenmikroskop (TEM) wird die Organisation der Thylakoidmembranen sichtbar, die die Photosysteme enthalten (Bild: Maximilian Humm und Stefan Geimer).

„Wer Botaniker oder Zoologe werden will ohne Mikroskop, ist mindestens ein ebenso großer Thor, als wer den Himmel beobachten will ohne Fernrohr.“ Mit diesem Satz hat der Botaniker Matthias Schleiden vor rund 150 Jahren in Jena den Mechaniker und Unternehmer Carl Zeiß davon überzeugt, Mikroskope zu produzieren und kommerziell zu vertreiben. Gemeinsam mit seinem Kollegen Theodor Schwann hatte Schleiden die Gewebe von Tieren und Pflanzen mikroskopisch untersucht und dabei erkannt, dass alle Organismen aus einer oder mehreren Zellen bestehen, und dass die Zelle die grundlegende Strukturinheit aller Organismen ist. Mit dieser Erkenntnis haben Schleiden und Schwann im Jahr 1839 die Zelltheorie begründet. Damit gehören sie ohne Zweifel zu den Vätern der modernen Biologie.

VON DER LICHTMIKROSKOPIE ZUR ELEKTRONENMIKROSKOPIE

An der grundsätzlichen Wahrheit von Schleidens Aussage hat sich bis heute nichts geändert: Wer den Aufbau und die Funktionsweise von Pflanzen und Tieren – oder auch von Mikroorganismen, Pilzen und menschlichen Geweben – verstehen will, braucht dazu Mikroskope. Je tiefer und detaillierter diese Einblicke sein sollen, desto komplizierter und aufwendiger konstruiert müssen die Mikroskope sein. Jedoch gibt es dabei eine durch die Physik des Lichts bedingte Grenze. Ernst Abbe war ein Physiker, der zusammen mit Carl Zeiß an der Entwicklung von Mikroskopen gearbeitet hat. Er erkannte, dass das Auflösungsvermögen eines Mikroskops – vereinfacht gesagt – der halben Wellenlänge des sichtbaren Lichts entspricht, also auf etwa 200 Nanometer begrenzt ist (ein Nanometer ist ein Millionstel Millimeter). Diese Auflösungsgrenze – auch Abbe-Limit genannt – hatte über 130 Jahre Gültigkeit und wurde erst in unserem Jahrhundert mit der Entwicklung der Super-Resolution-Microscopy mit einigen physikalischen Tricks überwunden.

Viele Objekte und Strukturen, die von Biologen untersucht werden, sind jedoch viel kleiner als das Abbe-Limit. Dazu gehören beispielsweise Viren, Zellorganellen oder Strukturelemente von Bakterien. Mit der Einführung der Elektronenmikroskopie in die zellbiologische Forschung wurde es ab der Mitte des 20. Jahrhunderts möglich, diese und andere Strukturen mit bis dahin ungeahnter Auflö-

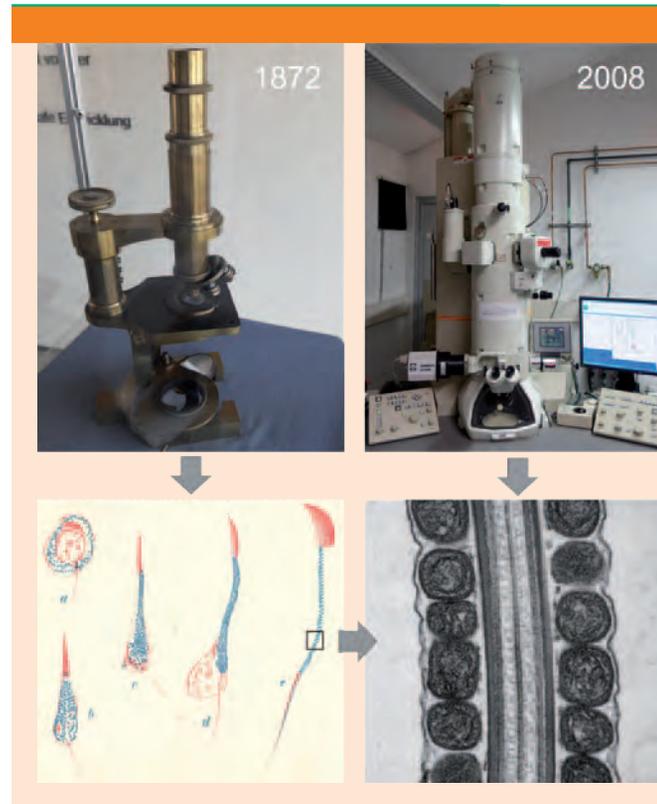


Abb. 1: Mit einfachen Färbetechniken und Lichtmikroskopen konnten Biologen im 19. Jahrhundert bereits einzelne Strukturen in Zellen darstellen. Die Abbildung zeigt ein Mikroskop-Stativ von Carl Zeiß von 1872 (ausgestellt im Abbe-Zentrum Beutenberg in Jena) und die Entwicklungsstadien einer Spermienzelle, wie sie im Buch „Allgemeine Biologie“ von Oscar Hertwig von 1912 dargestellt sind. Durch die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) können sehr viel kleinere Strukturen dargestellt werden, wie zum Beispiel die Elemente des Zytoskeletts und die Membranen der Zellorganellen. Zu sehen sind das TEM JEOL JEM-2100 im Labor für Elektronenmikroskopie der Universität Bayreuth und eine TEM-Aufnahme der Mitochondrien im Mittelstück von Spermienzellen (Fotos: Benedikt Westermann; TEM-Aufnahme: Stefan Geimer).

sung abzubilden. Im Elektronenmikroskop wird statt Licht ein Elektronenstrahl auf das Präparat gelenkt und anschließend detektiert. Da die Wellenlänge eines Elektrons sehr viel kleiner ist als die eines Photons, lässt sich eine mehr als 1000-fach höhere Auflösung erzielen. So können zelluläre Strukturen im Nanometerbereich problemlos abgebildet werden, wie zum Beispiel zelluläre Membranen oder Elemente des Zytoskeletts.

„DAS HOHE AUFLÖSUNGSVERMÖGEN DES ELEKTRONENMIKROSKOPS ERLAUBT FASZINIERENDE EINBLICKE IN KLEINSTE BIOLOGISCHE STRUKTUREN.“

Es gibt zwei unterschiedliche Arten von Elektronenmikroskopen: das Rasterelektronenmikroskop (REM) und das Transmissionselektronenmikroskop (TEM). Im REM wird ein biologisches Objekt, das zuvor mit einer sehr dünnen Edelmetallschicht bedampft wurde, im Vakuum mit einem Elektronenstrahl bestrahlt, der die Oberfläche abtastet. Dabei können beispielsweise Details von Blüten, Insekten oder planktonischen Organismen hochaufgelöst mit großer Tiefenschärfe abgebildet werden.

Im TEM wird der Elektronenstrahl durch die Probe hindurchgeschickt und anschließend mit einem

AUTOREN



Prof. Dr. Stefan Geimer ist Leiter des Labors für Elektronenmikroskopie der Biologie.



Prof. Dr. Benedikt Westermann ist Inhaber der Professur für Zellbiologie, der das Labor für Elektronenmikroskopie zugeordnet ist.

Leuchtschirm detektiert. Dafür muss die Probe vorher fixiert und in sehr dünne Scheiben von 60 bis 200 Nanometer Dicke geschnitten werden, was etwa einem Zehntausendstel Millimeter entspricht. Dadurch können beispielsweise Zellbestandteile wie Mitochondrien oder Chloroplasten mit höchster Auflösung abgebildet werden. Bei der Elektronentomographie wird die Probe im TEM gekippt und aus verschiedenen Winkeln abgebildet. Ähnlich wie bei der Computertomographie in der Medizin kann man aufgrund dieser Daten ein dreidimensionales Bild der Probe erhalten. So lassen sich zelluläre Strukturen in allen drei Dimensionen mit höchster Auflösung im Nanometerbereich rekonstruieren. Bei der Immunelektronenmikroskopie werden mit Goldpartikeln beladene Antikörper verwendet, um bestimmte Proteine in der Probe zu lokalisieren. Auf diese Weise können Proteine in der Zelle sehr viel genauer lokalisiert werden, als es beispielsweise mit der Fluoreszenzmikroskopie oder anderen lichtmikroskopischen Methoden möglich ist.

DAS LABOR FÜR ELEKTRONENMIKROSKOPIE DER BIOLOGIE

Das hohe Auflösungsvermögen des Elektronenmikroskops erlaubt faszinierende Einblicke in kleinste biologische Strukturen. Dies hat jedoch seinen Preis: die Elektronenmikroskope sind aufwendig konstruiert und dementsprechend teuer in der Anschaffung. Sie sind wartungsintensiv im Unterhalt, und die Proben müssen aufwendig präpariert werden, wozu einiges an Geduld, Geschick und Training gehört. Daher ist es notwendig, die Ge-

räte und das Knowhow in einem zentralen Labor zu vereinen und den interessierten Arbeitsgruppen zur Verfügung zu stellen.

Das Labor für Elektronenmikroskopie an der Universität Bayreuth bearbeitet eine Vielzahl von Projekten aus dem Bereich der Lebenswissenschaften. Insbesondere im TEM-Bereich konnte mit Unterstützung der Universität Bayreuth, des Freistaats Bayern und des Großgeräteprogramms der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) eine hervorragende Geräteausstattung etabliert werden. Im Jahr 2008 wurde durch die Beschaffung eines TEM mit 200 kV Beschleunigungsspannung die Technik der Elektronentomographie ermöglicht. Im Oktober 2016 wurde ein weiteres TEM beschafft, mit dem die Analyse von tiefgefrorenen Proben möglich ist (Cryo-TEM). An Peripheriegeräten sind unter anderem eine Hochdruckgefrieranlage und ein Cryo-Ultramikrotom verfügbar.

Die gute apparative Ausstattung und die im Labor vorhandene technische Expertise ermöglichen die Bearbeitung einer großen Vielzahl von Projekten zusammen mit zahlreichen Partnern. Neben Bayreuther Arbeitsgruppen aus der Biologie und den Ingenieurwissenschaften kooperiert das Labor mit externen Partnern im In- und Ausland, aktuell unter anderem mit Instituten der Max-Planck-Gesellschaft und der University of California at Davis/USA.

STRUKTUREN VON ZELLORGANELLEN

Die Untersuchung von Zellorganellen, wie zum Beispiel Chloroplasten und Mitochondrien, bildet einen besonderen Schwerpunkt unserer Arbeit.¹ Ohne Chloroplasten gäbe es kein höheres Leben auf der Erde. In diesen Zellorganellen, die in allen Pflanzen vorkommen, findet die Lichtreaktion der Photosynthese statt. Dadurch wird die Energie des Sonnenlichts in Stoffwechselenergie umgewandelt, so dass die Pflanze Zellbestandteile synthetisieren und wachsen kann. Die so gebildete pflanzliche Biomasse wiederum ist die Grundlage für die Nahrungsketten, durch die sich Tiere und Menschen ernähren. Die Lichtsammelkomplexe und Photosysteme befinden sich in den Thylakoidmembranen der Chloroplasten. Dabei handelt es sich um die komplexesten energieumwandelnden Membranen, die man kennt. Sie bilden ein zusammenhängendes Lamellensystem und sind an einigen Stellen zu geldrollenähnlichen Strukturen, den *Grana*, übereinandergestapelt.

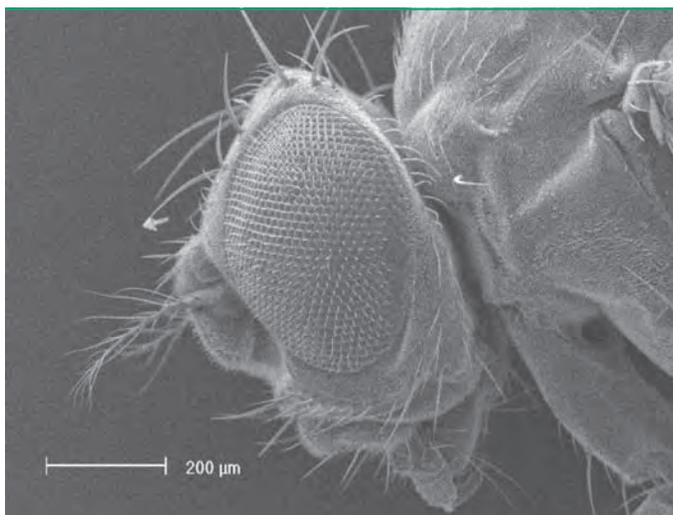


Abb. 2: Raster-elektronenmikroskopische (REM) Aufnahme eines Kopfes der Tauflye *Drosophila melanogaster* (Bild: Magdalena Jünger und Stefan Heidmann).



Abb. 3: Transmissionselektronenmikroskopische (TEM) Aufnahme von Mitochondrien in einer Hefezelle (Bild: Rita Grotjahn und Benedikt Westermann).

Während die Struktur und Funktion der Thylakoide relativ gut bekannt ist, weiß man kaum etwas darüber, wie sie gebildet werden. Die molekularen Mechanismen der Biogenese von Thylakoidmembranen werden seit 2014 von einer DFG-Forschergemeinschaft untersucht. In diesem Verbund mit dem Titel „Biogenesis of thylakoid membranes: Spatio-temporal organization of photosynthetic protein complex assembly“ kooperiert das Bayreuther Labor für Elektronenmikroskopie mit Arbeitsgruppen der Humboldt-Universität Berlin, der Ruhr-Universität Bochum, TU Kaiserslautern, der LMU München und des Max-Planck-Instituts für Molekulare Pflanzenphysiologie in Potsdam-Golm. Das Bayreuther Labor spielt dabei eine Schlüsselrolle, da die Membranstrukturen der Chloroplasten, die untersucht werden, so klein sind, dass sie nur durch die Elektronenmikroskopie dargestellt werden können.

Mitochondrien kommen in praktisch allen Zellen höherer Organismen vor und werden auch als „Kraftwerke der Zelle“ bezeichnet, da sie eine zentrale Rolle im Energiestoffwechsel spielen. Fehlfunktionen der Mitochondrien führen zu neurodegenerativen Erkrankungen, zum Beispiel Parkinson, und sind eine wichtige Ursache für das Altern von Geweben und Organismen. Mitochondrien sind Zellorganellen, die von zwei Membranen umgeben sind. Die Innenmembran bildet dabei Einstülpungen in die Matrix, die Cristae. Diese beherbergen die Atmungskettenkomplexe, die letztlich dafür verantwortlich sind, die in der Nahrung

enthaltene Energie für unseren Stoffwechsel verfügbar zu machen. Ähnlich wie die Thylakoide der Chloroplasten sind auch die Membranen der Mitochondrien und die Architektur der Cristae nur mit der Technik der Elektronenmikroskopie sichtbar zu machen. In mehreren von der DFG geförderten Projekten und in verschiedenen Kooperationen auf nationaler und internationaler Ebene untersuchen wir die molekularen Mechanismen, die die Architektur der Mitochondrien bestimmen.

Dies sind nur einige wenige Beispiele, die belegen, dass die Elektronenmikroskopie eine besonders leistungsfähige Methode ist, um faszinierende Einblicke in die Nanowelt der Zellen zu erhalten. Sie liefert nicht nur wichtige Beiträge für die Forschung, sondern ist auch für die Ausbildung des wissenschaftlichen Nachwuchses in der Molekular- und Zellbiologie unverzichtbar.

- 1 Aus diesen Forschungsarbeiten ist eine Vielzahl von Publikationen hervorgegangen, u.a.: Mackinder, L.C.M. et al. (2016). A repeat protein links Rubisco to form the eukaryotic carbon-concentrating organelle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 113:5958-5963. doi: 10.1073/pnas.1522866113. Schneider, A. et al. (2016). The evolutionarily conserved protein PHOTOSYNTHESIS AFFECTED MUTANT71 is required for efficient manganese uptake at the thylakoid membrane in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 28:892-910. doi: 10.1105/tpc.15.00812. Klecker, T. et al. (2013). The yeast cell cortical protein Num1 integrates mitochondrial dynamics into cellular architecture. *J. Cell Sci.*, 126:2924-2930. doi: 10.1242/jcs.126045. Connerth, M. et al. (2012). Intramitochondrial transport of a phosphatidic acid in yeast by a lipid transfer protein. *Science*, 338:815-818. doi: 10.1126/science.1225625.

Abb. 4: Masterstudentin Romina Bachstein B.Sc. bei Forschungsarbeiten am Transmissionselektronenmikroskop (TEM) (Foto: Peter Kolb).





MOLEKULARBIOLOGIE

■ OLAF STEMMANN

Das Ballett der Chromosomen

NEUE ERKENNTNISSE
ZUR CHOREOGRAPHIE
DER ZELLEILUNG

■ Künstlerische 3D-Darstellung
von Chromosomen (sst).

Chromosomen sichtbar zu machen und zu beobachten – dies wurde infolge der Entwicklung vergrößernder Linsen und primitiver Mikroskope erstmals in der Mitte des 19. Jahrhunderts möglich. Seitdem haben sie mit ihrem extremen Formenwandel und ihren dramatischen Bewegungen in sich teilenden Zellen die Forscher stets fasziniert. Tatsächlich führte der Vergleich zwischen dem ‚Chromosomenballett‘ bei der Keimzellenbildung (Meiose) und den Vererbungsregeln von Gregor Mendel bereits Anfang des 20. Jahrhunderts zu der Erkenntnis, dass die Chromosomen die Träger unserer Erbanlagen/Gene sind. Ein Verständnis der Chromosomenbiologie auf molekularer Ebene blieb jedoch für weitere rund 100 Jahre völlig aus, bis unser Wissen um die Jahrtausendwende plötzlich rasant zunahm. An dem seither unvermindert anhaltenden Erkenntniszuwachs in diesem Forschungsfeld sind auch Bayreuther Wissenschaftler um den Genetiker Prof. Olaf Stemmann beteiligt.

DER ZELLYKLUS: HÖCHSTLEISTUNGEN EN SCÈNE

Die Erbanlagen einer menschlichen Körperzelle sind auf 46 Chromosomen verteilt und in der Abfolge von 6,5 Milliarden DNS-Bausteinen gespeichert. Diese Information wird zunächst innerhalb des Zellkerns identisch verdoppelt (*Replikation*). Die dann vorliegenden 92 DNS-Doppelstränge werden in Vorbereitung auf die Zellteilung zunächst in Transportformen verpackt (*Kondensation*). Schließlich werden sie so verteilt, dass die beiden entstehenden Tochterzellen von jedem Chromosom je eine Kopie erhalten (*Segregation*). Diese Vorgänge müssen sich millionenfach fehlerfrei wiederholen, damit sich aus einer befruchteten Eizelle ein aus rund 10^{14} Zellen bestehender, gesunder Erwachsener entwickeln kann.

Dass die Replikation, Kondensation und Segregation der Chromosomen schier unglaubliche Leistungen unserer Zellen darstellen, können folgende Vergleiche ansatzweise deutlich machen: Die Replikation entspricht dem Abschreiben von drei Millionen Buchseiten – innerhalb weniger Stunden und praktisch fehlerfrei! Denkt man sich 1.000 Kilometer Drachenschnur in einen Hüpfball gestopft, so würde die Kondensation bedeuten, dass man daraus innerhalb von wenigen Minuten 92 Spulen aufwickelt, ohne dass sich die Schüre verknötet oder verheddert. Und bei der Segregation

ist es so, als würde man aus einem Haufen von 92 Socken die 46 Paare richtig identifizieren – wieder innerhalb weniger Minuten und mit verbundenen Augen, denn die Zelle ist ja blind.



Abb. 1 und 2:
Doktorandin
Kristina Seel M.Sc. bei der
Mikroskopie einer fluo-
reszenzmarkierten Probe
(Foto und mikroskopische
Aufnahme: Lehrstuhl
für Genetik, Universität
Bayreuth).

DER CHROMOSOMENZYKLUS: VOM PAS-DE-DEUX ZUR ZELLTEILUNG

Dank intensiver Grundlagenforschung ist es heute teilweise möglich, diese beeindruckenden zellulären Leistungen in ihren Mechanismen zu erklären. So liegt die DNS nicht als chaotisches Knäuel vor, sondern wird von Proteinen aufgewickelt und in Schlaufen organisiert. Knoten, die zwangsläufig entstehen, werden einfach entfernt, indem DNS-Fäden vorübergehend zerschnitten und dann wieder ohne Rückstände repariert werden. Für die DNS-Verdopplung verfügt die Zelle über sehr schnelle molekulare Kopiermaschinen, die etwa 1.000 DNS-Bausteine pro Sekunde abschreiben. Dennoch ist die DNS-Replikation nur dadurch schnell genug, dass Tausende dieser Kopiermaschinen gleichzeitig arbeiten.

Ferner werden die identischen Kopien eines jeden Chromosoms, die sogenannten Schwesterchromatiden, schon bei ihrer Entstehung miteinander gepaart. So ist sichergestellt, dass das Problem der späteren Zuordnung gar nicht erst entsteht. Der Zusammenhalt der Schwesterchromatiden wird dabei durch Kohäsine vermittelt, einen aus mehreren Proteinbausteinen bestehenden Molekülkomplex. Dieser umschließt die beiden DNS-Fäden der Schwesterchromatiden ringförmig und hält sie so verpaart. Damit die DNS-Fäden dann während der Zellteilung – der Mitose – getrennt werden können, ist das Enzym Separase unerlässlich. Einmal aktiviert, wirkt dieses Enzym als Protease, die ge-

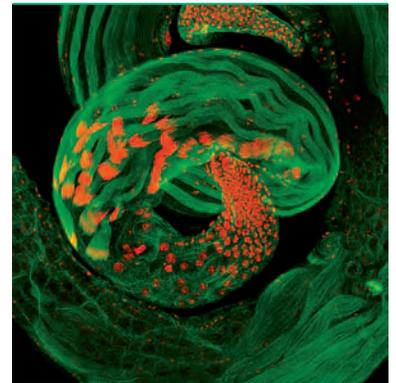
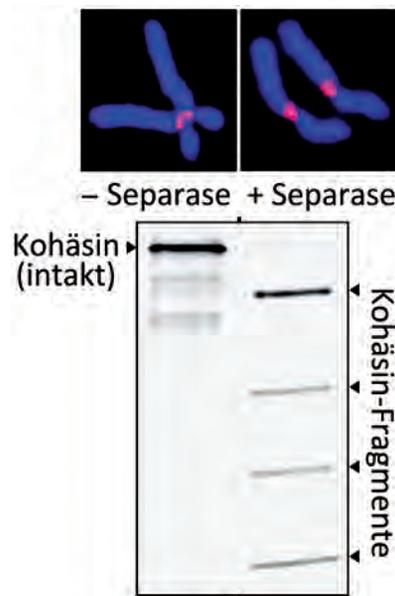


Abb. 3: Die Chromosomentrennung lässt sich im Reagenzglas nachahmen und studieren. Werden Chromosomen (blau gefärbt, mit Kinetochoren in rot) mit aktiver Separase inkubiert, so trennen sie sich in ihre Schwesterchromatiden (rechts). Dies geht einher mit der Spaltung von Kohäsin in kleinere Bruchstücke (unten). (Bild: LS für Genetik, Universität Bayreuth).



Damit sich bei der nächsten Zellteilung wieder eine bipolare Spindel bilden kann, muss das Zentrosom – ähnlich den Chromosomen – vor der nächsten Zellteilung zunächst verdoppelt werden. Jetzt kommen die Zentriolen ins Spiel, zwei tonnenförmige Strukturen im Innern des Zentrosoms. Vor der Zellteilung stehen sie in engem Kontakt rechtwinklig aufeinander, unmittelbar danach verlieren sie aber ihre enge Kopplung. Tatsächlich stellt diese Entkopplung die Voraussetzung für die spätere Verdopplung des Zentrosoms dar. Diese findet zeitgleich mit der DNS-Replikation statt und besteht darin, dass an den beiden existierenden Zentriolen jeweils ein neues Zentriol auswächst.

AUTOR



Prof. Dr. Olaf Stemmann ist Inhaber des Lehrstuhls für Genetik an der Universität Bayreuth.

**DER ZENTROSOMENZYKLUS:
ENTRÉE DES SPINDELAPPARATS**

Der Transport der Schwesterchromatiden wird von zwei Zellorganellen organisiert, die bereits Ende des 19. Jahrhunderts von dem deutschen Zellbiologen Theodor Boveri beschrieben und Zentrosomen getauft wurden. Von ihnen strahlen viele winzige röhrenartige Fasern aus, die miteinander und mit den Chromosomen verbunden werden. Dadurch entsteht der sogenannte Spindelapparat (Abb. 6). Die Zentrosomen bilden die zwei Pole dieses Apparats, in dessen Mitte die zu trennenden Chromosomen angeordnet werden. Sobald die Kohäsion durch die Tätigkeit der Separase aufgehoben ist, entfernen sich nicht nur die Schwesterchromatiden, sondern auch die Zentrosomen in einander entgegengesetzte Richtungen. Dies gelingt auf folgende Weise: Die Spindelfasern, die mit den Chromosomen interagieren, werden verkürzt; gleichzeitig werden die Spindelfasern, die von entgegengesetzten Polen kommend miteinander im Kontakt stehen, verlängert und von molekularen Motoren gegeneinander verschoben. Schließlich schnürt sich die Zelle in der Mitte durch, so dass zwei Tochterzellen mit identischer Chromosomenausstattung und je einem Zentrosom entstehen.

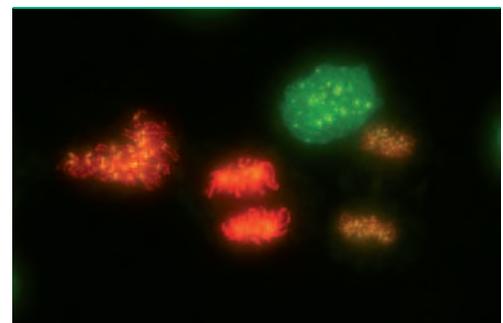
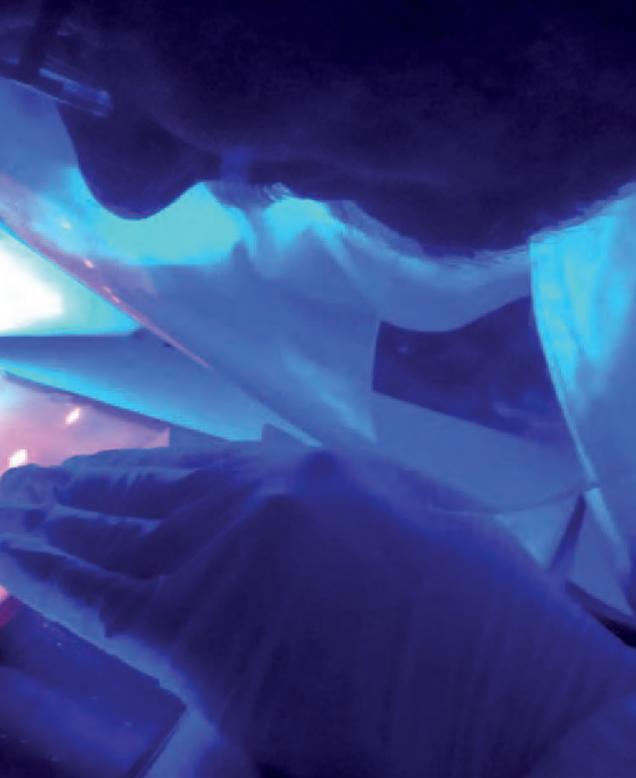


Abb. 4 (rechts): Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von menschlichen Krebszellen in verschiedenen Zellzyklusstadien. In sich teilenden Zellen (v.l.n.r.: Prometa-, Ana- und Telophase) wurden die Chromosomen rot gefärbt. Eine Zelle, die ihre Chromosomen gerade verdoppelt (S-Phase, oben) wurde grün angefärbt. In allen Zellen wurden die Kinetochore, die Anheftungsstellen für Mikrotubuli auf den Chromosomen, gelb gefärbt. (Bild: LS für Genetik, Universität Bayreuth).

EXAKTE CHOREOGRAPHIE

Die sehr komplexen Einzelvorgänge im Zellzyklus müssen nicht nur äußerst exakt ablaufen; die verschiedenen Prozesse müssen auch zeitlich sinnvoll aufeinander abgestimmt werden. Gelingt dies einmal nicht, kommt es zu einer DNS-Schädigung oder einer Fehlverteilung von Chromosomen:



Alterung, Tod oder Entartung von Zellen können die Folgen sein. Um diese Herausforderungen zu meistern, bedient sich die Natur immer wieder der folgenden vier Mechanismen:

„WICHTIGE SCHRITTE IM ZELLYKLUS WERDEN DURCH BIOLOGISCHE SCHALTER AUSGELÖST, DIE NUR IN EINE RICHTUNG – NÄMLICH VON ‚AUS‘ NACH ‚EIN‘ – FUNKTIONIEREN.“

1. Wichtige Zellzyklus-Übergänge sind redundant reguliert. Infolgedessen laufen sie selbst dann noch robust ab, wenn ein Kontrollmechanismus mal ausfällt. Eine verfrühte Trennung der Schwesterchromatiden wird zum Beispiel normalerweise dadurch verhindert, dass Separase zunächst gemeinsam mit dem Inhibitor Securin vorliegt, also mit einem Protein, das die Separase hemmt. Dennoch sind Mäuse, denen Securin fehlt, lebensfähig und gesund, weil ihre Zellen es schaffen, Separase durch andere Eiweiße zu inhibieren. Manche dieser alternativen Regulationsmechanismen sind inzwischen aufgeklärt worden.¹ Genetische Befunde deuten aber an, dass es noch weitere Geheimnisse zu lüften gilt.

2. Wichtige Schritte im Zellzyklus werden durch biologische Schalter ausgelöst, die nur in eine Richtung – nämlich von ‚Aus‘ nach ‚Ein‘ – funktionieren und keine Zwischenzustände haben (nicht ‚ein bisschen an‘ sein können). Anders gesagt: Sie sind *unidirektional*, *irreversibel* und *binär*. Die Schwesterchromatidtrennung wird zum Beispiel dadurch ausgelöst, dass Securin abgebaut und

Separase freigesetzt wird, um dann ihrerseits Kohäsine zu spalten. Beide Vorgänge sind unumkehrbar; zerstörtes Securin und Kohäsine können erst im nächsten Zellzyklus durch Neusynthese ersetzt werden. Die andere Eigenschaft biologischer Schalter, also die, binär zu sein, wird typischerweise dadurch sichergestellt, dass die von ihnen ausgelösten Vorgänge sich selbst verstärken. Durch eine solche positive Rückkopplung wird zum Beispiel der Securinabbau, wenn er einmal begonnen hat, immer schneller und effektiver. Dies führt dazu, dass er rasch bis zur Vollständigkeit abläuft.²

3. Wichtige Zellzyklus-Übergänge werden von übergeordneten Kontrollmechanismen zusätzlich überwacht. Ist die Zelle noch nicht bereit für den nächsten Schritt, halten diese sogenannten *checkpoints* den Zellzyklus an, um Zeit für die Fehlerkorrektur zu geben. Ein entsprechender Kontrollmechanismus in der Mitose verhindert zum Beispiel den Abbau von Securin so lange, bis alle Chromosomen ordnungsgemäß mit den Fasern des Spindelapparates interagieren und zur Segregation bereit sind.

4. Um die vielen im Zellzyklus ablaufenden Ereignisse sinnvoll aufeinander abzustimmen, werden oft die gleichen Eiweiße mehrmals in unterschiedlichem Kontext verwendet. So vermittelt Kohäsine nicht nur die Paarung der Schwesterchromatide, sondern trägt gleichzeitig auch zur Kopplung der Zentriolen bei. Wenn dann Separase in der Mitose aktiv wird und Kohäsine schneidet, löst dies folglich nicht nur die Trennung der Schwesterchromatiden aus. Gleichzeitig wird durch Entkopplung der Zentriolen auch die spätere Zentrosomenduplikation vorbereitet.³ Auf diese Weise werden der Chromosomen- und Zentrosomenzyklus zeitlich miteinander koordiniert.

Auch wenn alle diese Erkenntnisse uns helfen, manche der faszinierenden Aspekte des Zellzyklus besser zu verstehen, so bleiben doch viele beeindruckende zelluläre Leistungen weiterhin rätselhaft. Diese zu entschlüsseln und dabei zu klären, welche Kontrollen bei schweren Erkrankungen wie Krebs ausfallen, bleiben wichtige Aufgaben zukünftiger Forschungen.

Abb. 5: Doktorand Philip Kahlen M.Sc. bei einem Arbeitsschritt des Klonierens, einer Technik, die die funktionelle Charakterisierung von Genen ermöglicht (Foto: Lehrstuhl für Genetik, Universität Bayreuth).

- 1 S. Hellmuth et al.: Positive and negative regulation of vertebrate separase by Cdk1-cyclin B1 may explain why securin is dispensable (2015), in: The Journal of Biological Chemistry 290(12), pp. 8002-8010, doi: 10.1074/jbc.M114.615310. – S. Hellmuth et al.: Human chromosome segregation involves multi-layered regulation of separase by the peptidyl-prolyl-isomerase Pim1, in: Molecular Cell (2015), 58(3), pp. 495-506, doi: 10.1016/j.molcel.2015.03.025.
- 2 S. Hellmuth et al.: PP2A delays APC/C-dependent degradation of separase-associated but not free securin (2014), in: EMBO J. 33(10), pp. 1134-47.
- 3 Schöckel L et al.: Cleavage of cohesin rings coordinates the separation of centrioles and chromatids (2011), Nat Cell Biol. 10;13(8):966-72. doi: 10.1038/ncb2280.

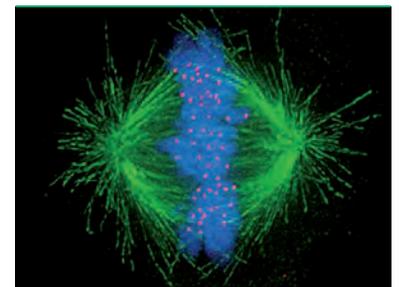
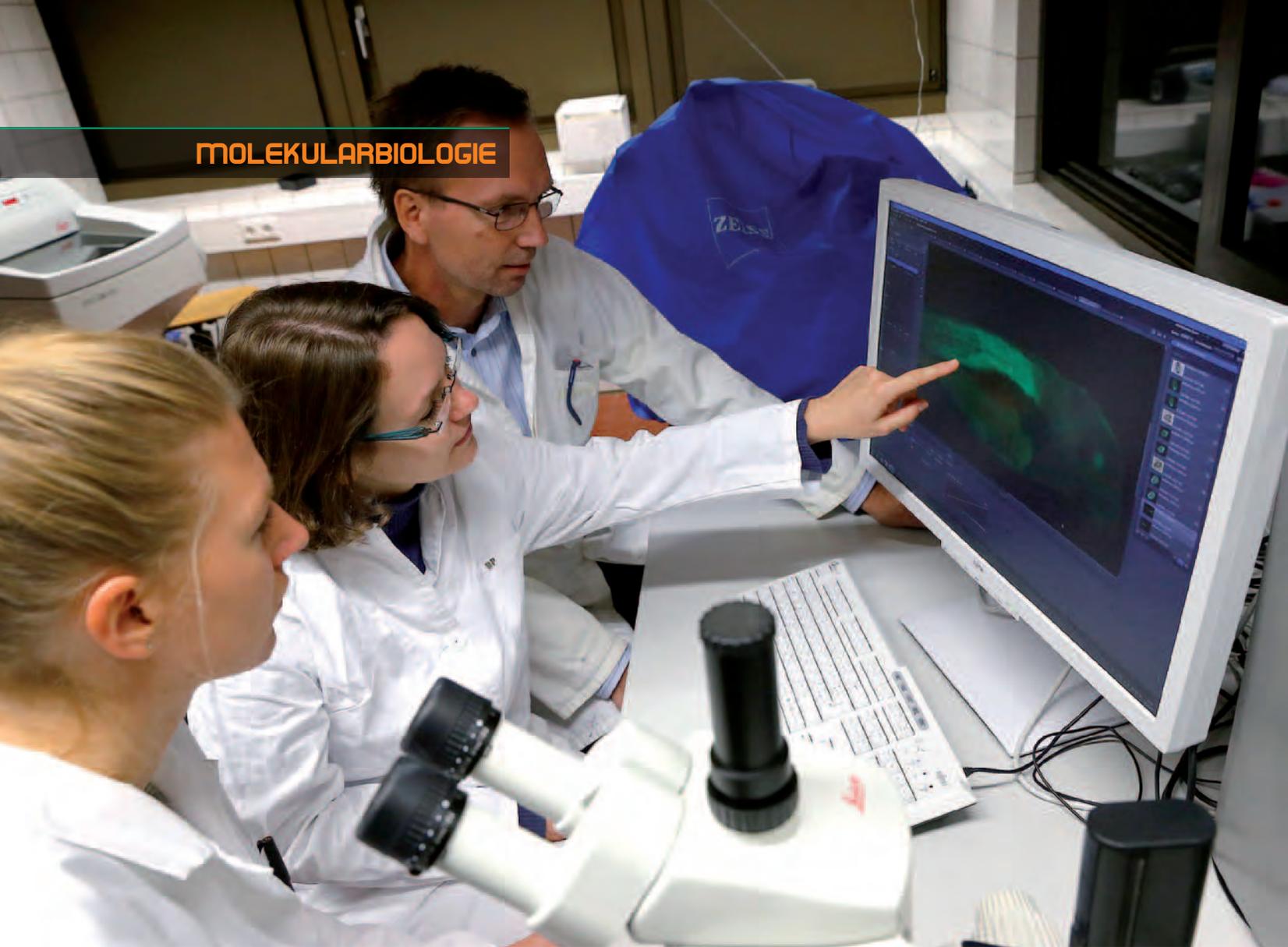


Abb. 6: Bild des Spindelapparates in einer menschlichen Zelle während der Zellteilung (Metaphase). Die röhrenförmigen Spindelfasern (Mikrotubuli) sind grün, die Chromosomen blau dargestellt; rot markiert sind die Kinetochore, die Anheftungsstellen für Mikrotubuli auf den Chromosomen (Bild: Wikimedia Commons).



■ GERRIT BEGEMANN

Fisch und Mensch

EIN KLEINES MOLEKÜL STEUERT DIE ENTWICKLUNG VON EXTREMITÄTEN

■ Ausgewählte Zellen des Embryos leuchten unter dem Fluoreszenzmikroskop und ermöglichen so die Identifizierung bestimmter Gewebe (Foto: Peter Kolb).

Aangeborene Fehlbildungen der Gliedmaßen treten bei 0,1 bis 0,2 Prozent aller Geburten auf. Häufig betroffen sind Finger oder Zehen, in seltenen Fällen kommt es zu schweren Defekten bei Armen und Beinen. Auch in der Evolution spielt der Verlust von Gliedmaßen eine wesentliche Rolle. Bei Wirbeltieren hat die Evolutionsgeschichte dazu geführt, dass die Beine bei Schlangen und Blindschleichen verschwunden sind. Wale und Delfine verloren ihre funktionslosen Hinterextremitäten, und bei vielen der flugunfähigen Vögel sind die Flügel, wie bei den Kiwis, zu unscheinbaren Stummeln verkümmert. Tatsächlich stammt auch der Mensch, wie alle Säugetiere, letzten Endes von den Fischen ab. Deshalb verwundert es nicht, dass unsere Arme und Beine aus den Brust- und Bauchflossen jener Fische entstanden sind, die erstmals das Wasser verließen und fortan amphibisch oder ganz an Land lebten. Fische haben während der Evolution so häufig die hinteren Extremitäten verloren, dass Carl von Linné die Klassifizierung der Fische 1894 nach den Bauchflossen vornahm. Er würdigte das Phänomen mit einer eigenen Ordnung innerhalb der Fische, den ‚fußlosen‘ Fischen (*Pisces Apodes*).

Scheinbar sind die Bauchflossen entbehrlich und die Brustflossen nicht – aber warum ist das so? Das Skelett der vorderen Extremitäten unterstützt bei Fischen die Kiemenatmung und das Verschlucken von Beute. Dadurch könnten schon kleine evolutive Veränderungen der Brustflossen zu schweren Beeinträchtigungen bei der Atmung und Nahrungsaufnahme führen. Das Skelett der hinteren Extremitäten dagegen dient ausschließlich der Verankerung der Bauchflossen. Dass deren Verlust hinnehmbar ist, zeigen etliche Familien von Fischen, unter ihnen die Aale. Sie kommen gänzlich ohne Bauchflossen, nie aber ohne Brustflossen aus.

FISCHE ALS MODELLORGANISMEN

Um auf den Ebenen von Zellen und Genen zu verstehen, wie die Gliedmaßen von Wirbeltieren gebildet werden, untersucht man diese komplexen Prozesse an Modellorganismen. Der Zebraquariabläbling ist ein kleiner tropischer Fisch, der in der biomedizinischen Forschung hohe Wellen schlägt. Er eignet sich hervorragend, um Embryonen beim Wachsen zuzuschauen, denn die Fischeier sind zahlreich, entwickeln sich außerhalb der Mutter und sind komplett durchsichtig. Infolge ihrer

Transparenz kann man ohne Eingriffe von außen beobachten, wie Vorgänge bei der Entstehung eines Organs, des Blutgefäß- oder Skelettsystems ablaufen. Noch wichtiger ist, dass es eine große Anzahl unterschiedlicher Zuchtformen von Zebraquariabläblingen mit genetischen Defekten der Gliedmaßenentwicklung gibt (Abb. 1).

„WILL MAN FEHLENTWICKLUNGEN VON MENSCHLICHEN GLIEDMASSEN VERSTEHEN, KANN MAN DIE ZU GRUNDE LIEGENDE GENETIK AN FISCHFLOSSEN ERFORSCHEN.“

Ausschlaggebend für die Forschung mit Zebraquariabläblingen ist die Erkenntnis, dass sich sehr viele Erkrankungen des Menschen im Fisch simulieren lassen. Denn die meisten der beteiligten Mechanismen sind so tiefgreifend in der Evolution verankert, dass sie in Fischen und im Menschen annähernd gleich ablaufen. Will man Fehleentwicklungen von menschlichen Gliedmaßen verstehen, kann man die zu Grunde liegende Genetik an Fischflossen erforschen.

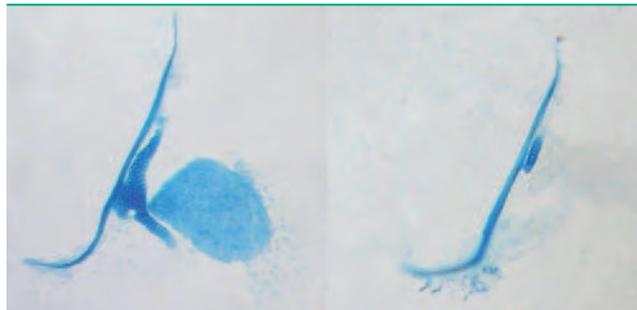


Abb. 1: An Schulterblatt und Schlüsselbein einer Zebraquariabläblinglarve (in der Form eines Bumerangs) hängt eine flache Knorpelscheibe, aus der sich die Knochen der Brustflosse entwickeln. Rechts: Bei einer mutanten Linie ohne Retinsäure entwickeln sich die Brustflossen nicht (Mikroskopische Aufnahme: Gerrit Begemann).

RETINSÄURE: UNENTBEHRLICH FÜR DEN KONTROLLIERTEN ABLAUF DER EMBRYONALENTWICKLUNG

Es gibt eine große Anzahl von Genen, die bei der Entwicklung der Gliedmaßen eine Rolle spielen. Einige von ihnen sind nur in den Hinterextremitäten aktiv, wie beispielsweise das *Tbx4*-Gen in den Bauchflossen (Abb. 2). Die meisten Gene werden aber in beiden Gliedmaßen benötigt und sind auch an weiteren Prozessen der Embryonalentwicklung beteiligt. Ein Beispiel hierfür spielt in der Arbeitsgruppe von Professor Gerrit Begemann eine zentrale Rolle: Retinsäure ist ein kleines Molekül, das in der Entwicklung aller Wirbeltiere wie ein Ein/Aus-Schalter für bestimmte Gene funktioniert.¹

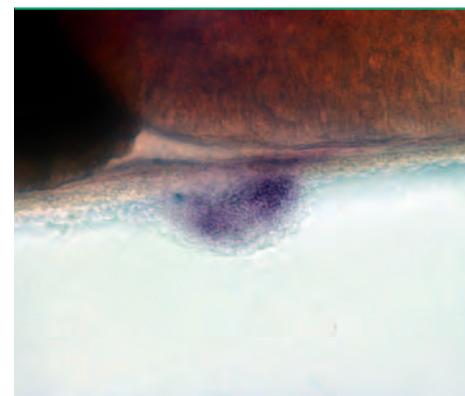


Abb. 2: Farblicher Nachweis für die Aktivität des *Tbx4*-Gens in einer sich entwickelnden Bauchflosse (Mikroskopische Aufnahme: Gerrit Begemann).



Abb. 3: Vor der Untersuchung von Embryonen werden unbefruchtete Eier der Zebrafische unter dem Mikroskop aussortiert, am Mikroskop: Doktorandin Heidrun Draut M.Sc. (Foto: Peter Kolb).

Abb. 4 (rechts): Ein Zebrafischweibchen kann bis zu 100 Eier legen. Eizellen und Embryonen sind transparent und somit gut zu beobachten (Foto: Peter Kolb).

Abb. 5: Die Larve eines Zebrafischs, 6 Wochen alt und 1 cm lang (Mikroskopische Aufnahme: Gerrit Begemann).



pe herausfinden, dass Retinsäure von der Rumpfmuskulatur produziert wird und von dort auf die Vorläuferzellen der Brustflossen wirkt.² Retinsäure blockiert hier die Wirkung eines anderen Signalmoleküls, das die Entwicklung der benachbarten Herzvorläuferzellen unterstützt. Die Wechselwirkung der konkurrierenden Signale teilt den gemeinsamen Zellpool so auf, dass Herz- und Brustflossenentwicklung gemeinsam aus ihm gespeist werden.

Der Körper kann Retinsäure nicht selber herstellen, sondern gewinnt sie über die Nahrung aus dem Vitamin A oder als Embryo aus dem Vitaminvorrat des Dotters. Im Embryo stellen spezialisierte Zellen in sich entwickelnden Organen ein Enzym her, das aus Vitamin A Retinsäure gewinnt. Von dort aus kann Retinsäure wie ein Funksignal auf umliegende Zellen abgestrahlt werden, in deren Zellkerne eindringen und dort gezielt eine Reihe von Genen aktivieren. Diese kontrollieren zum Beispiel in den Gliedmaßen, aber auch im Herz und Zentralen Nervensystem, wichtige Entwicklungsschritte.

Die Arbeitsgruppe Entwicklungsbiologie hat entdeckt, dass eine Mutation im Enzym, das Retinsäure zur Verfügung stellt, zu schweren Entwicklungsdefekten dieser Organe führt. Ohne Retinsäure bildet sich kein Skelett in der Schulterregion, und die Vorderextremitäten fehlen. Durch eine zeitlich genau abgestimmte Blockade der Retinsäureproduktion in gesunden Embryonen konnte die Arbeitsgrup-

pe herausfinden, dass Retinsäure von der Rumpfmuskulatur produziert wird und von dort auf die Vorläuferzellen der Brustflossen wirkt.² Retinsäure blockiert hier die Wirkung eines anderen Signalmoleküls, das die Entwicklung der benachbarten Herzvorläuferzellen unterstützt. Die Wechselwirkung der konkurrierenden Signale teilt den gemeinsamen Zellpool so auf, dass Herz- und Brustflossenentwicklung gemeinsam aus ihm gespeist werden.

Neuere von der DFG-geförderte Studien haben außerdem gezeigt, dass Retinsäure für die Regeneration ausgewachsener Flossen mitverantwortlich ist. Verletzt sich ein Zebrafisch an der Flosse, so wächst das amputierte Gewebe innerhalb von zwei Wochen komplett nach. Dabei kontrolliert Retinsäure die Zellteilung im nachwachsenden Gewebe und sorgt überdies dafür, dass sich Knochenzellen vermehren und wieder so verteilen, dass die Gesamtstruktur des Flossenskeletts wieder hergestellt wird.³

ENTWICKLUNGSPROZESSE SICHTBAR MACHEN

Wie unterscheidet sich die Entwicklung von Vorder- und Hinterextremitäten? Hier liegt der aktuelle Schwerpunkt der entwicklungsbiologischen Forschung in Bayreuth. Jetzt, da bekannt ist, wie Retinsäure die vorderen Gliedmaßen kontrolliert, stellt sich die Frage, ob das in den Bauchflossen des Zebrafischs genauso funktioniert. Die Frage ist weder trivial, noch ist sie im Hinblick auf den derzeitigen Stand der Forschung einfach zu beantworten. Denn einerseits haben Untersuchungen an Mäusen ergeben, dass sich die Hinterbeine anscheinend auch ohne Retinsäure bilden; andererseits widerspricht dieser Befund dem gegenwärtigen Modell, wie sich Extremitäten bei Wirbeltieren grundsätzlich entwickeln: nämlich entlang einer räumlichen Achse, die auf der Rumpffseite von Retinsäure kontrolliert und an der Spitze der

auswachsenden Extremität von einem anderen Wachstumsfaktor gesteuert wird. Wenn dies zutrifft, würde Retinsäure auch die Entwicklung der Hinterextremitäten beeinflussen. Die geplanten Untersuchungen an Fischen als Modellsystem können also dazu beitragen, diesen grundlegenden Entwicklungsprozess bei Wirbeltieren aufzuklären.

Die Bauchflossen bei Zebraabrlingen entstehen erst nach 3 bis 4 Wochen in jungen Larven von 1 cm Länge (Abb. 5). Die Beobachtung der Bauchflossenentwicklung gelingt am lebenden Tier durch Zuchtlinien, bei denen bestimmte Zelltypen durch farbige Proteine sichtbar gemacht werden. Diese Moleküle leuchten unter schwachem UV-Licht rot oder grün (Abb. 6), ohne die Fischlarve zu beeinträchtigen. Auf diese Weise ist es möglich, einzelne Zellen unter dem Mikroskop zu identifizieren und sie über einen Zeitraum zu beobachten, während sie sich zu Knorpelzellen entwickeln und schließlich das Skelett der Bauchflossen anlegen. Um die Funktionen von Retinsäure zu untersuchen, lässt sich die Flossenentwicklung an den leuchtenden Zellen verfolgen, während man ihnen entweder zu viel oder

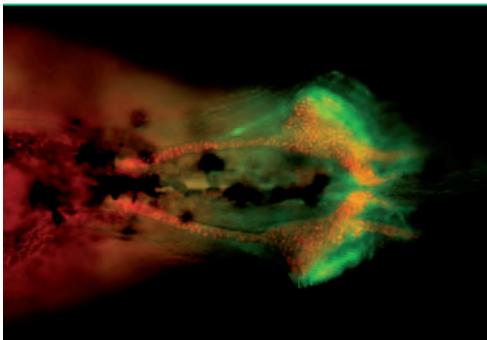


Abb. 6: Das Skelett der Bauchflossen einer Zebraabrlingslarve. Ausgewachsene Knorpelzellen sind rot markiert, Bindegewebszellen mit Knorpelvorläufern leuchten grün (Mikroskopische Aufnahme: Gerrit Begemann).

zu wenig Retinsäure anbietet. Letzteres ist möglich, indem man das Enzym Cyp26a1, das Retinsäure abbaut, gezielt in den Zellen der Bauchflossen aktiviert. Hierfür werden genetisch gezielt veränderte Linien von Zebraabrlingen benötigt, bei denen Cyp26a1 ausschließlich in den Bauchflossen aktiviert werden kann. Gleichzeitig gibt es genetische Tricks, mit denen sich auch die zeitliche Komponente der Aktivierung kontrollieren lässt. Sobald ein solches System eingerichtet und erfolgreich getestet worden ist, können präzise Veränderungen am Retinsäurevorrat vorgenommen werden, ohne dass andere Organe davon betroffen sind.



Abb. 7: Masterstudentin Marlene Schmidt B.Sc. untersucht DNA-Sequenzen, die für die Regulation der Flossenentwicklung notwendig sind (Foto: Peter Kolb).

WAS FISCH UND MENSCHEN VERBINDET

Trotz der Komplexität und relativen Häufigkeit erblicher Defekte bei der Entwicklung von Gliedmaßen sind die zu Grunde liegenden zellulären Vorgänge noch immer nicht ausreichend verstanden. Untersuchungen an geeigneten Tiermodellen bieten die Chance, ganz gezielt einzelne Faktoren in der Entwicklung an- oder auszuschalten. Fische und Menschen stammen von gemeinsamen Vorfahren ab, die – auch wenn es schon sehr lange her ist – bereits paarweise angeordnete Gliedmaßen zur Fortbewegung besaßen. Gesteuert wurde die Entwicklung dieser Gliedmaßen von Genen, die auch heute noch in Fisch und Mensch die Baupläne für Arme, Beine und die dazu homologen Flossen umsetzen.

Zebraabrlinge gewähren der Forschung präzise Einblicke in die hochkomplexe Entwicklung des Embryos zum erwachsenen Tier. Sie bieten die Möglichkeit, die an dieser Entwicklung beteiligten Wechselwirkungen zwischen Zellen, Geweben und Organen sowie deren genetische Steuerung gezielt zu untersuchen. Dadurch können wir auch etwas über den Menschen lernen, bei dem uns solche direkten Einblicke verwehrt bleiben.

AUTOR



Prof. Dr. Gerrit Begemann ist Professor für Entwicklungsbiologie an der Universität Bayreuth.

- 1 Vgl. dazu N. Blum, G. Begemann: 2013. The roles of endogenous retinoid signaling in organ and appendage regeneration. *Cellular and Molecular Life Sciences*. doi:10.1007/s00018-013-1303-7.
- 2 Y. Gibert et al.: 2006. Induction and prepatterning of the zebrafish pectoral fin bud requires axial retinoic acid signaling. *Development* 133: 2649-2659.
- 3 N. Blum, G. Begemann: 2015. Retinoic acid signaling spatially restricts osteoblasts and controls ray-interray organization during zebrafish fin regeneration. *Development* 142:2888-2893, doi: 10.1242/dev.120212, N. Blum, G. Begemann: 2015. Osteoblast de- and redifferentiation are controlled by a dynamic response to retinoic acid during zebrafish fin regeneration. *Development* 142:2894-903, doi: 10.1242/dev.120204.



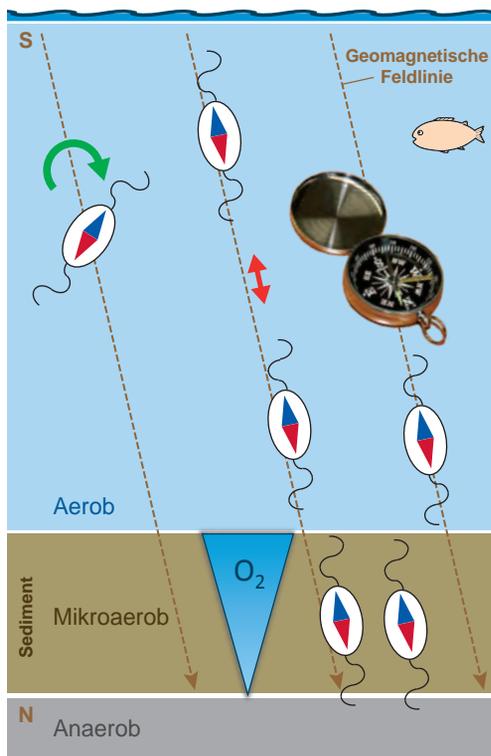
■ DIRK SCHÜLER

Mikroben mit Kompass

WIE BAKTERIEN MAGNETISCHE ORGANELLEN HERSTELLEN

■ Theresa Zwiener M.Sc., Doktorandin am Lehrstuhl für Mikrobiologie, führt einen Routine-Schnelltest mit dem Würfelmagneten durch: Sind die Bakterien im Kulturröhrchen magnetisch? (Foto: Christian Wißler).

Die Fähigkeit, sich in magnetischen Feldern zu orientieren, beschränkt sich nicht auf höhere Organismen wie Zugvögel, einige Fische, Insekten oder Fadenwürmer. Sie findet sich auch in manchen Mikroorganismen. Diese sogenannten magnetotaktischen Bakterien kommen zahlreich im Schlamm von Gewässern vor und besitzen im Inneren besondere Organellen, die Magnetosomen. Diese bestehen aus Nanokristallen eines magnetischen Eisenminerals, die von einer Membran umgeben sind (Abb. 1). Jeder einzelne dieser Partikel stellt einen winzigen Magneten dar, der je nach Bakterienart eine genau definierte Form und Größe besitzt. Die molekularen Mechanismen, die an der Biosynthese und Funktion dieser einzigartigen Magnetsensoren beteiligt sind, stehen im Mittelpunkt der Forschungsarbeiten am Lehrstuhl für Mikrobiologie.



Besonders gut untersucht ist inzwischen das Bakterium *Magnetospirillum gryphiswaldense*. Als eines der wenigen natürlich vorkommenden Magnetbakterien lässt es sich im Labor züchten und auch genetisch manipulieren. *M. gryphiswaldense* dient als Modell für die Erforschung der Magnetfeldorientierung von Mikroorganismen, für die Unter-

suchung von bakteriellen Zellorganellen sowie für die Analyse von molekularen Prozessen, die an der Biomineralisation – also der Bildung von Mineralen durch Organismen – beteiligt sind.

ZELLULÄRE KOMPASSNADELN FÜR DIE NAVIGATION IM NATÜRLICHEN LEBENSRAUM

Magnetische Bakterien schwimmen mit Hilfe von rotierenden Geißeln. Wenn sie sich im natürlichen Lebensraum bewegen, ist die Ausrichtung jeder einzelnen Zelle, ähnlich der einer Kompassnadel, durch die vertikal geneigten Feldlinien des Erdmagnetfelds vorgegeben. Jedoch kann die Zelle auf Umweltsignale in der Weise reagieren, dass sie die Richtung ihrer Schwimmbewegung umkehrt. Wie das Forschungslabor am Lehrstuhl für Mikrobiologie herausgefunden hat, wird dies ermöglicht durch ein Zusammenspiel mit weiteren komplexen molekularen Sensorsystemen für die Wahrnehmung von Sauerstoff. Die Bakterien bevorzugen zwar etwas Sauerstoff für die Zellatmung, werden aber in ihrem Wachstum gehemmt, sobald der Sauerstoffgehalt in ihrer Umgebung zu hoch wird. Daher richten sie ihr Schwimmverhalten stets so aus, dass sie entlang der geomagnetischen Feldlinien sehr effizient in Regionen gelangen, in denen die Sauerstoffkonzentration optimal niedrig ist. Solche Bedingungen finden sie vor allem in tieferen Sedimentschichten am Grund von natürlichen Gewässern (Abb. 2).

EXAKTE STEUERUNG KOMPLIZIERTER SYNTHESE-PROZESSE

Ein Schwerpunkt der Bayreuther Forschungsarbeiten besteht darin, den Mechanismus der Biosynthese von Magnetosomen zu ergründen. Damit eine optimale magnetische Sensorfunktion erreicht wird, muss die Anzahl, Größe, Form und Magnetisierung der Magnetosomenpartikel präzise reguliert werden. Wie sich herausgestellt hat, führt die mikrobielle Biosynthese tatsächlich zu Magnetosomen mit beeindruckend genau definierten Eigenschaften:¹ Jeder einzelne Partikel besteht aus einem Einkristall des magnetischen Eisenoxids Magnetit (Fe_3O_4) und ist im reifen Zustand nahezu exakt 45 Nanometer groß. Um diese Kristalle herzustellen, bilden die Bakterienzellen winzige „Nanoreaktoren“, spezielle Membranvesikel, in denen die optimalen Bedingungen für die Bildung von Magnetit genau eingestellt werden können.

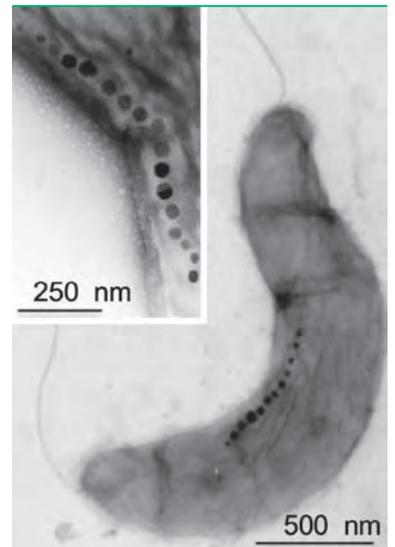


Abb. 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme des magnetischen Bakteriums *Magnetospirillum gryphiswaldense*. Die Zellen enthalten eine Kette von Magnetosomen, die als dunkle Strukturen sichtbar sind und eine Größe von bis zu 45 Nanometer haben. Die Aufnahme links oben zeigt eine Vergrößerung der Magnetosomenkette. An den Zellpolen ist jeweils eine Geißel erkennbar (Aufnahme: Dirk Schüler).

Abb. 2: Schema der magnetischen Navigation im natürlichen Lebensraum: Ähnlich einer magnetischen Kompassnadel richten sich die Bakterien entlang des nach unten geneigten Erdmagnetfelds aus. Durch aktive Schwimmbewegungen finden sie mit Hilfe eines aerotaktischen Sensorsystems auf sehr effektive Weise die von ihnen bevorzugten sauerstoffarmen (mikroaeroben) Sedimente am Grund von natürlichen Gewässern. Darin nimmt die Sauerstoffkonzentration in einem Gradienten nach unten hin ab (Grafik: Dirk Schüler/Christian Göppner).

Wie die Forschungsarbeiten am Lehrstuhl für Mikrobiologie weiterhin zeigen konnten, unterliegt nicht nur die Bildung der einzelnen Magnetitkristalle, sondern auch deren Anordnung innerhalb der Zelle einer exakten biologischen Steuerung. Bis zu hundert Kristalle müssen zu einer linearen Kette hintereinander angeordnet werden, damit ein magnetisches Dipolmoment entsteht, das stark genug ist, die Zelle im relativ schwachen Erdmagnetfeld auszurichten. Zudem müssen die

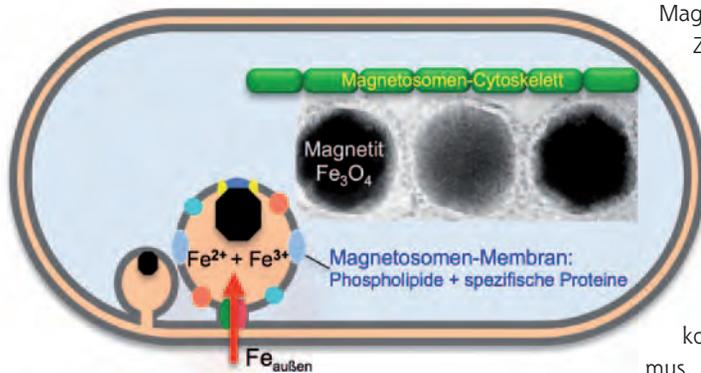


Abb. 3: Vereinfachtes Schema der Magnetosomen-Biosynthese in einem magnetischen Bakterium. Durch spezifische Transportproteine werden große Mengen Eisen von außerhalb der Zelle in die Magnetosomen-Vesikel aufgenommen. Diese dienen gewissermaßen als ‚Nanoreaktoren‘, in denen die Herstellung der Magnetitkristalle durch bestimmte Proteine genau gesteuert wird. Die Kristalle werden dann entlang dem Magnetosomen-Cytoskelett in regelmäßigen Ketten angeordnet. Hierbei handelt es sich um eine Struktur, die aus fadenförmigen Zellstrukturen (Filamenten) aufgebaut ist und aus dem Protein MamK besteht. Dieses Protein fungiert möglicherweise selbst als molekularer Motor, der für die richtige Positionierung und Weitergabe der Magnetosomenketten bei der Zellteilung sorgt (Grafik: Dirk Schüller).

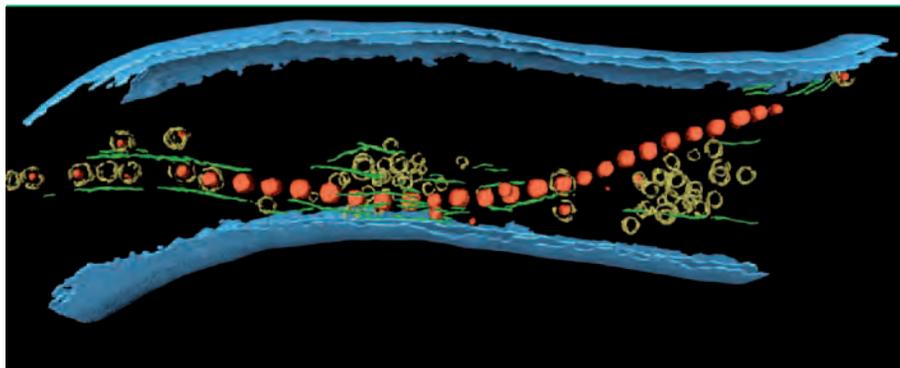


Abb. 4: Cryo-Elektronentomographische 3D-Rekonstruktion einer *M. gryphiswaldense*-Zelle mit den Magnetitkristallen (rot) und den Vesikeln (gelb). Die Vesikel werden von der Magnetosomenmembran (blau) gebildet und entstehen durch Abschnürung aus der Zellmembran (blau). Die reifenden Magnetitkristalle werden entlang den Filamenten (grün) des Magnetosomen-Cytoskeletts zu Ketten angeordnet (Aufnahme und Bildbearbeitung: Mauricio Toro-Nahuelpan, UBT/MPI f. Biochemie, Martinsried).

Magnetitkristalle bei der Zellteilung möglichst gleichmäßig an die Tochterzellen weitergegeben werden. Auch für diese Prozesse nutzen die vermeintlich primitiven Bakterienzellen einen unerwartet komplizierten Mechanismus. Eine zentrale Funktion hat dabei ein Protein namens MamK², das dem aus höheren Organismen bekannten Cytoskelettprotein Aktin ähnelt (Abb. 3 und 4).

ZAHRLICHE GENFUNKTIONEN STEUERN DIE BIOSYNTHESE DER MAGNETOSOMEN

Bisher konnte die Bayreuther Forschungsgruppe rund 50 verschiedene Genfunktionen identifizieren, die im Zusammenspiel die Bildung der hochgeordneten Magnetosomenketten steuern. Die wichtigsten Magnetosomen-Gene sind in enger Nachbarschaft hintereinander auf der DNA der Bakterien angeordnet. Sie kodieren Proteine, die

eine Vielzahl spezieller Funktionen übernehmen: den Transport von Eisen, dessen Oxidation und Reduktion, die Bildung der Membranvesikel, die Steuerung des Kristallwachstums, die intrazelluläre Anordnung und vieles mehr.

Die gerichtete Inaktivierung oder Modifikation der Magnetosomen-Gene half nicht nur dabei, diese Funktionen aufzuklären. Sie führte überdies zu interessanten Mutanten mit veränderter Form, Größe und Anordnung der Magnetosomenpartikel und somit zu deren unterschiedlichen magnetischen Eigenschaften. So gelang es vor kurzem, einen ungewöhnlich leistungsfähigen Bakterienstamm zu erzeugen. Dieser ist imstande, mehr als doppelt so viele und zudem deutlich größere Magnetkristalle zu synthetisieren. Damit ist er für deren biotechnologische Herstellung hochinteressant.

MASSGESCHNEIDERTE MAGNETNANOPARTIKEL FÜR VERSCHIEDENE ANWENDUNGEN

Bakterielle Magnetosomen sind aber nicht nur wegen ihrer biologischen Funktion als Magnetfeldsensoren für die Forschung interessant. Im Laufe der Evolution wurden ihre Eigenschaften optimiert, ihr Zusammenbau ist fein reguliert, und so weisen sie besondere Merkmale auf, die sie auch für eine Reihe biotechnologischer oder biomedizinischer Anwendungen sehr attraktiv machen. Auf rein technischem Wege ist es nämlich bisher noch nicht gelungen, Magnetnanopartikel von ähnlich einheitlicher Größe, struktureller Perfektion und Formenvielfalt sowie nahezu idealen magnetischen Eigenschaften herzustellen.

Magnetosomen, die aus Bakterien isoliert wurden, haben sich in ersten Versuchen gegenüber chemisch hergestellten Kristallen als überlegen erwiesen – zum Beispiel als Kontrastmittel für bildgebende Verfahren wie MPI (*magnetic particle imaging*) und MRI (*magnetic resonance imaging*), oder auch bei der Erzeugung von Wärme durch Magnetfelder (*Magnetische Hyperthermie*). Für die Zukunft sind daher interessante biomedizinische Anwendungen denkbar. So könnten bakterielle Magnetosomen zum Beispiel für die gleichzeitige Diagnose und Bekämpfung (*Theranostik*) von Tumorzellen eingesetzt werden. Ebenso könnten sie als Vehikel genutzt werden, um beispielsweise Medikamente magnetisch exakt an ihren Bestimmungsort zu dirigieren.

Für fast alle Anwendungen von Magnetosomen müssen deren Eigenschaften jedoch optimiert oder erweitert werden. Die Forschungsgruppe um Prof. Dirk Schüler hat in den letzten Jahren damit begonnen, je nach Anwendung maßgeschneiderte magnetische Nanostrukturen herzustellen – und zwar durch zielgerichtete genetische Veränderung der Bakterien. So können Form und Größe der Magnetitkristalle gezielt so modifiziert werden, dass sich daraus unterschiedliche magnetische Eigenschaften ergeben. Darüber hinaus ist es möglich, zellfremde bioaktive Moleküle – zum Beispiel fluoreszente Moleküle, Enzyme oder sogar tierische Antikörper – über die Magnetosomen-Membran an die Magnetitkristalle anzukoppeln. Diese gewinnen dadurch ganz neue Eigenschaften und zusätzliche Funktionen.



Abb. 5: An der Sterilwerkbank: Dr. Marina Dziuba, Wissenschaftlerin am Lehrstuhl für Mikrobiologie, entnimmt Bakterienkolonien aus einer Kulturschale. Die keimfreie Arbeitsatmosphäre verhindert ungewollte Verunreinigungen (Foto: Christian Wißler).

GENETISCHE MAGNETISIERUNG VON FREMDEN ORGANISMEN?

Für die Analyse, Veränderung und Anwendung der Magnetosomen entwickelt die Bayreuther Mikrobiologie Verfahren, die eine Anzucht der Bakterien auch in größerem Maßstab ermöglichen. Besonders vielversprechend erscheint jedoch die Idee, die genetischen Grundlagen aus den ursprünglichen schlammbewohnenden Bakterien in andere Mikroorganismen zu übertragen, die sich im Labor leichter handhaben lassen. Dies ist ein keineswegs triviales Unterfangen. Kürzlich ist es dem Team am Lehrstuhl für Mikrobiologie jedoch erstmals gelungen, die Fähigkeit zur Magnetosomenbildung in ein fremdes Bakterium zu „transplantieren“. Somit war der Beweis erbracht, dass es prinzipiell möglich ist, eine so komplexe Struktur in einem fremden Organismus herzustellen.³

Dieser Erfolg ist die Grundlage für ein größeres Forschungsvorhaben am Lehrstuhl für Mikrobiologie, das seit September 2016 vom European Research Council (ERC) mit einem *Advanced Grant* gefördert wird. Ziel des Projekts „Syntomagx“ ist

„BAKTERIELLE MAGNETOSOMEN WEISEN BESONDERE MERKMALE AUF, DIE SIE AUCH FÜR EINE REIHE BIOTECHNOLOGISCHER ODER BIOMEDIZINISCHER ANWENDUNGEN SEHR ATTRAKTIV MACHEN.“

es, in den nächsten fünf Jahren den genetischen Bauplan der Biosynthese von Magnetosomen vollständig zu identifizieren und schließlich zu modifizieren. Dabei sollen genetische Module aus *M. gryphiswaldense*, sowie aus anderen – bisher nicht im Labor kultivierbaren – Magnetbakterien in das Genom von fremden, zuvor unmagnetischen Mikroorganismen eingeschleust werden. Der Transfer soll diese Mikroorganismen dazu befähigen, Magnetosomen mit maßgeschneiderten Eigenschaften herzustellen.

Langfristig könnte so ein molekularer Baukasten für die Herstellung von ‚Designer-Magnetnanopartikeln‘ entstehen. Durch die Übertragung von ausgewählten bakteriellen Genen könnte es in Zukunft möglicherweise sogar gelingen, Zellen höherer Organismen mit magnetischen Eigenschaften auszustatten. Daraus würden sich spannende Perspektiven für die Magnetogenetik, ein noch junges Teilgebiet der biomedizinischen Grundlagenforschung, ergeben – zum Beispiel im Hinblick auf die Sichtbarmachung von Zellstrukturen oder die Untersuchung zellulärer Prozesse.

AUTOR



Prof. Dr. Dirk Schüler ist Inhaber des Lehrstuhls für Mikrobiologie an der Universität Bayreuth.

- 1 R. Uebe, and D. Schüler: Magnetosome biogenesis in magnetotactic bacteria. *Nature Reviews Microbiology* (2016), 14, pp. 621–637, doi:10.1038/nrmicro.2016.99.
- 2 M. Toro-Nahuelpan et al.: Segregation of prokaryotic magnetosomes organelles is driven by treadmilling of a dynamic actin-like MamK filament, in: *BMC Biology* (2016), 14:88. doi: 10.1186/s12915-016-0290-1.
- 3 I. Kolinko et al.: Biosynthesis of magnetic nanostructures in a foreign organism by transfer of bacterial magnetosome gene clusters, in: *Nature Nanotechnology* (2014) 9, pp.193–197, doi: 10.1038/nnano.2014.13.

■ THOMAS SCHEIBEL
JOSCHKA BAUER

Die Schwarze Witwe und ihre Künste

BAYREUTHER WISSENSCHAFTLER
ENTSCHLÜSSELN MOLEKÜL-
STRUKTUREN UND TEILE DES
ASSEMBLIERUNGSMECHANISMUS
DER SPINNENSEIDE

■ Europäische Schwarze Witwe (*Latrodectus
tredecimguttatus*) (Foto: Wikimedia Commons).

Spinnenseide ist ein faszinierendes Material: Belastbarer als Stahl, dehnbarer als Nylon, und dünner als ein menschliches Haar. Sie lässt sich ohne Rückstände biologisch abbauen, löst keine Allergien aus und kann bis zu einem Viertel ihres Eigengewichts an Wasser aufnehmen. Wie gelingt es der Spinne, dieses einzigartige Material herzustellen, das wie keine andere Faser derartige Vorzüge vereint? Die molekularbiologischen Forschungen am Lehrstuhl für Biomaterialien der Universität Bayreuth haben in den letzten Jahren entscheidend dazu beitragen können, Licht in diese Künste der Spinne zu bringen. Für deren Verständnis ist es zunächst wichtig, sich den allgemeinen Bauplan der Spinnenseide vor Augen zu führen.

Der Spinnenseidenfaden besteht aus einem Netzwerk an Seidenproteinen, die sich jeweils aus drei Abschnitten zusammensetzen, sogenannte Domänen: Eine große Kerndomäne besteht aus kurzen, sich wiederholenden Aminosäuresequenzen ähnlich einem molekularen LEGO-Gebilde, das sich aus immer wiederkehrenden Einzelbausteinen (die alle gleich aussehen) zusammensetzt. Die Kerndomäne wird an beiden Enden von einzigartigen Domänen (sozusagen von ‚Sonder-Bausteinen‘) flankiert. Diese werden in Bezug auf eine freie Aminogruppe als ‚N-terminale Domäne‘ und in Bezug auf eine Carboxyl-Gruppe als ‚C-terminale Domäne‘ bezeichnet. Während sich verschiedene Seidenproteine hinsichtlich der Aminosäuresequenz in den Kerndomänen unterscheiden, weisen sie eine hohe Identität in ihren End-Domänen auf.

Die Bayreuther Forschungsgruppe um Prof. Thomas Scheibel hat herausgefunden, dass die außerordentlichen Eigenschaften der Spinnenseide wesentlich den Strukturen zu verdanken sind, die aus diesen ‚dreiteiligen‘ Proteinen gebildet werden. Die Entstehung des Spinnenseidenfadens ist ein fein differenzierter Prozess, der sich in verschiedenen Abschnitten der Spinnendrüse abspielt.

IM DRÜSENSACK DER SPINNE: PROTEINE IN WÄSSRIGER LÖSUNG

Zunächst einmal finden sich die einzelnen, im Drüsen Gewebe synthetisierten Proteine im Drüsen sack der Spinne zusammen. Hier bilden sie, wie die Bayreuther Wissenschaftler herausgefunden haben, kugelförmige Strukturen (Mizellen), die Eigenschaften von Flüssigkristallen aufweisen. Bereits in



diesem Stadium beginnt die Vernetzung: Jeweils zwei Proteine lagern sich parallel zueinander an und verklammern sich über ihre C-terminalen Domänen. Diese Klammer wird durch eine chemische Bindung (Disulfidbrücke) noch verstärkt. So entstehen jeweils *Dimere*: Paare von Seidenproteinen, die an ihrem einen Ende zusammengebunden sind und an den zwei losen Enden von den zunächst partnerlosen N-terminalen Domänen begrenzt werden. Dies gewährleistet, dass die Proteinketten sich in der wässrigen Lösung frei bewegen können und nicht verklumpen. Diese gute Löslichkeit wird durch die wasserliebenden C- und N-terminalen Domänen vermittelt, die sich auf der Oberfläche der Mizelle befinden.

IM SPINNKANAL: ÜBERGANG ZUM REISSFESTEN MATERIAL

Der Übergang von einer Proteinlösung zu einem Seidenfaden wird forciert, sobald die Spinne die Dimere in den Spinnkanal drückt. Jetzt ändert sich die chemische Umgebung der Proteine: Der pH-Wert sinkt schrittweise von 7.2 auf 6.0, und der Salzgehalt verringert sich. In einer kürzlich veröffentlichten Studie¹ hat die Bayreuther Forschungsgruppe herausgefunden, dass diese neuen Umgebungsbedingungen in den N-terminalen Domänen Umstrukturierungsprozesse auslösen, die für die Entstehung eines reißfesten und elastischen Seidenfadens ganz entscheidend sind. Die N-terminalen Domänen weisen nämlich zwei räumlich getrennte Bereiche auf ihrer Oberfläche auf. Diese

Abb. 1: Mit Hilfe von molekularbiologischen Methoden konnten die Gene der Seidenproteine von der Schwarzen Witwe auf Darmbakterien übertragen werden. Im Labor: Doktorand Joschka Bauer M.Sc. und Doktorandin Vanessa Trossmann M.Sc. (Foto: Christian Wißler).



Abb. 2: Die Spinnenseidenproteine werden rekombinant in Bakterien hergestellt. Um an die Proteine zu gelangen, schließt Joschka Bauer M.Sc. die Zellen mit Hilfe eines Hochdruck-Homogenisators auf (Foto: Christian Wißler).

Abb. 3: *E. coli* in der Tieftemperatur-Elektronenmikroskopie. (Foto: United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, ID K11077-1, Quelle: Wikimedia Commons).

AUTOREN



Prof. Dr. Thomas Scheibel ist Inhaber des Lehrstuhls für Biomaterialien an der Universität Bayreuth (Foto: © AMSilk GmbH).



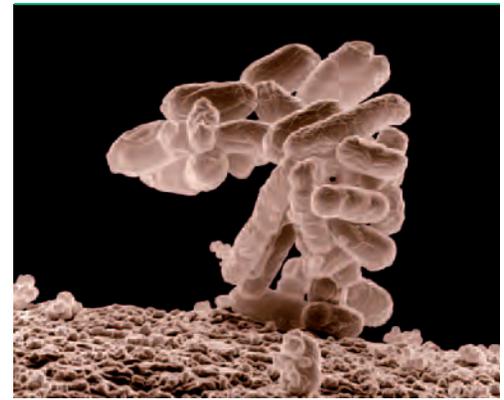
Joschka Bauer M.Sc. ist wissenschaftlicher Mitarbeiter und Doktorand am Lehrstuhl für Biomaterialien.

Abb. 4: In der wässrigen Lösung der Spinnndrüse sind die N-terminalen Domänen noch partnerlos (die C-terminalen Domänen sind in der Drüse schon dimerisiert). Beim Übergang in den Spinnkanal dimerisieren auch die N-Termini, und es entsteht dadurch eine sehr lange Kette quervernetzter Proteine, die im Prinzip endlos fortgesetzt werden könnte (Grafik: Joschka Bauer).

enthalten saure Aminosäureseitenketten, die bei neutralem pH-Wert (pH 7) eine negative Ladung aufweisen – und zwar deshalb, weil sie im Drüsenack Protonen an ihre Umgebung abgegeben haben. Im Detail lassen sich innerhalb der Domäne eine Glutaminsäure an Position 114 („E114“) sowie eine räumlich davon entfernte Gruppe von Asparagin- und Glutaminsäuren an den Positionen „D39“, „E76“ und „E81“ unterscheiden. Das Absenken des pH-Wertes im Spinnkanal bewirkt, dass die zunächst negativ geladenen Aminosäurereste mit positiv geladenen Protonen bestückt werden. Anders gesagt: Sie werden ‚protoniert‘, und ihre negative Ladung wird neutralisiert.

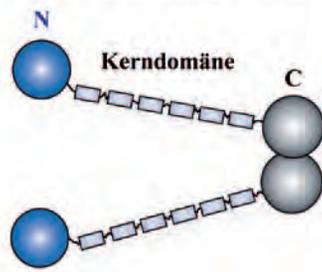
Die Bayreuther Wissenschaftler haben nun am Beispiel einer Seidendomäne der Schwarzen Witwe im Detail aufgeschlüsselt, wie diese Vorgänge die N-terminalen Domänen beeinflussen. Dafür haben sie zunächst die genetische Information für die N-terminale Domäne eines Seidenproteins aus der Schwarzen Witwe gewonnen. Mit Hilfe von molekularbiologischen Techniken wurde das zuständige Gen an den interessantesten Positionen (Aminosäuren) mutiert. Anschließend wurden sowohl das originale Wildtypgen wie auch die neu designten (mutierten) Gene auf Darmbakterien des Stammes *Escherichia coli* übertragen (Abb. 3). In Bioreaktoren wurden die *E. coli* anschließend kultiviert; dabei produzierten sie die N-terminale Domäne und ihre Varianten. Solche Proteine, die mit gentechnisch veränderten Organismen biotechnologisch hergestellt werden, nennt man in der Forschung ‚rekombinante Proteine‘.

Nachdem die bakterieneigenen Proteine von den Spinnenseidenproteinen abgetrennt waren, konnten die rekombinanten N-terminalen Domänen nun mit Hilfe biochemischer Methoden charakterisiert werden. Dabei stellte sich folgendes heraus (Abb. 4):



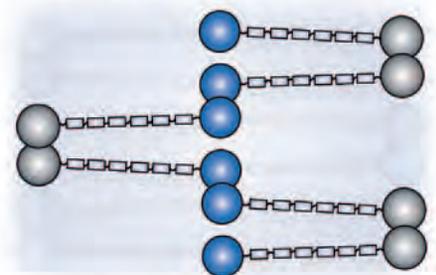
- Die Protonierung von Aminosäure E114 bewirkt, dass jede N-terminale Domäne eine zweite N-terminale Domäne als Partner findet. Dabei stabilisieren elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen die antiparallel zueinander ausgerichteten Domänen. Da in der Drüse der Spinne bereits jeweils zwei Proteine über die C-terminale Domäne verbunden sind, führt die Dimerisierung der N-terminalen Domäne zur weiteren Quervernetzung der Seidenproteine. Dies ist der Startpunkt für eine Verknüpfung zu einem langen Molekül, im Prinzip könnte die Verknüpfung endlos fortgesetzt werden.
- Damit die Bindung zwischen den zwei N-terminalen Domänen stabilisiert wird, bedarf es eines zusätzlichen unabhängigen Prozesses, der von einer räumlich entfernten Gruppe aus Aminosäuren kontrolliert wird. Die Protonierung der Seitenketten D39, E76 und E91 löst einen Strukturwechsel – die Forschung spricht von einer Konformationsänderung – der N-terminalen Domäne aus. Durch die Strukturänderung können zusätzliche Bindungen zwischen beiden N-terminalen Domänen ausgebildet werden.

Lösliches Seidenprotein



Dimerisierung
von N

Assemblierte Seidenproteine



Diese Erkenntnisse wurden unter anderem durch den Einsatz der magnetischen Kernresonanzspektroskopie (NMR) in enger Zusammenarbeit mit der Gruppe von Prof. Stephan Schwarzingler am Lehrstuhl für Biopolymere gewonnen. Mittels NMR-spektroskopischer Untersuchungen konnte die Proteinstruktur der N-terminalen Domäne präzise bestimmt werden. So ließen sich zielgenau die Aminosäuren identifizieren, die einerseits an der Dimerisierung, andererseits an der Strukturänderung beteiligt sind.

Das Netzwerk aus quervernetzten Seidenproteinen wird im engen Spinnkanal in Längsrichtung aufgrund von Scherkräften aneinandergespreßt. Die entstehenden Proteinstränge lagern sich zu einem

Seidenfaden zusammen, der schließlich von der Spinne aus der Spinndüse herausgezogen wird.

„MITTELS NMR-SPEKTROSKOPISCHER UNTERSUCHUNGEN KONNTE DIE PROTEINSTRUKTUR DER N-TERMINALEN DOMÄNE PRÄZISE BESTIMMT WERDEN.“

Dass die Quervernetzung der Proteine, ihre Assemblierung, von der N-terminalen Domäne präzise kontrolliert wird, ist entscheidend für die Entstehung eines Seidenfadens mit einer in der Natur unübertroffenen Kombination von Reißfestigkeit und Elastizität.

Spinnen wie die Spinne: Biomimetische Anwendungen

Auf der Grundlage der bis dahin erzielten molekularbiologischen Erkenntnisse ist es dem Forschungsteam um Prof. Thomas Scheibel im Jahr 2013 erstmals gelungen, Seidenfäden herzustellen, welche die gleiche mechanische Belastbarkeit wie natürliche Spinnenseide aufweisen.² Bei dieser biotechnologischen Herstellung der Seidenproteine im Labor wurden keine Spinnen, sondern speziell präparierte *E. coli*-Bakterien eingesetzt. Heute verfügt der Lehrstuhl über eine Spinnanlage, mit der mit Hilfe der Bakterien im Labor hergestellte Seidenproteine in stabile Fasern versponnen werden können.

Damit wurde die Tür zu einer noch unabsehbaren Vielfalt neuer Materialien und neuer Produkte aufgestoßen, die nicht zuletzt für die Biomedizin von großem Interesse sind. Die Bayreuther Wissenschaftler haben mit Hilfe einer weiteren Verarbeitungstechnologie bereits eine Biotinte aus Seidenproteinen entwickelt. Damit können zukünftig im 3D-Drucker komplexe Gewebe produziert werden, die zum Beispiel bei Organtransplantationen angewendet werden können. Des Weiteren wurden Ummantelungen für Brustimplantate entwickelt, die geeignet sind, schmerzhafte entzündliche Gewebekapselungen zu vermindern. Cremes aus Seidenproteinen, die bereits im Handel erhältlich sind, sorgen für eine ausreichende Feuchtigkeit der Haut, schützen diese vor Umwelteinflüssen und verleihen ihr einen natürlichen Glanz.



Abb. 5: 3D-gedrucktes Ohr auf der Basis von Spinnenseide (Foto: Universität Würzburg).



Abb. 6: Ein hochleistungsfähiges Produkt: Spinnenseidenfasern aus biotechnologisch hergestellten Proteinen mit naturidentischen mechanischen Eigenschaften (Bild: Fa. AMSilk, Planegg/Martinsried).

- 1 J. Bauer et al.: Residues Control the Dimerization of the N-terminal Domain of Black Widow Spiders' Major Ampullate Spidroin 1, *Scientific Reports* 6, no. 34442 (2016), doi:10.1038/srep34442.
- 2 Aniela Heidebrecht et al.: Biomimetic Fibers Made of Rekombinant Spidrons with the same Toughness as Natural Spider Silk, *Advanced Materials* (2015), 27/13, doi: 10.1002/adma.201404234.

Den „guten“ und „bösen“ Metallen auf der Spur

BAYREUTHER FORSCHUNG AN
MIKROELEMENTEN IN PFLANZEN

Doktorandin Nicole Nagler M.Sc. bei der Infiltration von Tabakpflanzen. Die natürliche „Genfahre“ *Agrobacterium tumefaciens* wird in die Blätter eingebracht und sorgt für die transiente (vorübergehende) Expression von Proteinen. Diese können dann biochemisch und zellbiologisch untersucht werden (Foto: Christian Wißler).

Jedes Lebewesen benötigt eine Reihe verschiedener Metalle. So ist zum Beispiel im menschlichen Körper Sauerstofftransport ohne Eisen nicht möglich, können Verdauungsenzyme ohne Zink nicht arbeiten. Etwa ein Drittel aller Proteine in Pflanzen und Tieren (zu denen natürlich auch der Mensch zählt) enthalten für ihre jeweilige Funktion essentielle Metallatome. Tiere nehmen diese Metalle durch den Verzehr von Pflanzen oder von anderen Tieren auf, welche sie wiederum durch das Fressen von Pflanzen aufgenommen haben. Letztlich hängt also praktisch die gesamte Versorgung mit Metallen wie Zink und Eisen von der Fähigkeit der Pflanzen ab, diese aus dem Boden aufzunehmen und in alle Gewebe und Organe zu transportieren. Da etwa die Hälfte der Weltbevölkerung nicht genügend Eisen und Zink mit der Nahrung aufnimmt, ist ein wichtiges Ziel der Pflanzenwissenschaften die Entwicklung von Nutzpflanzen mit höheren Eisen- und Zink-Gehalten. Dies wird Biofortifikation genannt.¹

Leider nehmen Zellen nicht nur die häufig auch als Mikroelemente bezeichneten essentiellen Metalle auf, sondern auch solche, die den Mikroelementen ähnlich sind. Das hochgiftige Schwermetall Cadmium zum Beispiel kann mit Zink „verwechselt“ werden. Da es durch jahrhundertelange industrielle Aktivitäten wie Bergbau oder Erzverarbeitung großflächig in die Umwelt ausgebracht worden ist, findet es sich auch in Böden und wird von Pflanzen aufgenommen. Zwar sind die Raten verglichen mit Zink gering, doch führt diese Aufnahme dennoch zu einer relevanten Cadmium-Belastung unserer Nahrung. Da der menschliche Körper Cadmium praktisch nicht ausscheiden kann, akkumuliert das Schwermetall für Jahrzehnte und kann zu gesundheitlichen Risiken führen. Die European Food Safety Authority (EFSA) hat deshalb empfohlen, die erlaubten Grenzwerte für Cadmium in Nahrungsmitteln zu senken.²

DREI FORSCHUNGSSTRATEGIEN

Forschungsarbeiten am Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie verfolgen das Ziel, die molekularen Mechanismen der Aufnahme und Verteilung von Metallen wie Zink und Cadmium in Pflanzen aufzuklären. Hunderte von Genen und Proteinen wirken zusammen, um in jeder Zelle, in jedem Gewebe und in jedem Organ für die richtige Zink-Konzentration und -Verteilung zu sorgen. Viele dieser

Gene und Proteine beeinflussen auch die Akkumulation von Cadmium. Das grundlegende Verständnis der Mechanismen soll dabei helfen, Pflanzen mit höheren Mikroelementgehalten und weniger Cadmium zu entwickeln.

Drei Strategien der Bayreuther Forschungsgruppe lassen sich unterscheiden:

- Mutanten mit gestörter Zink-Homöostase werden im molekulargenetischen Modellsystem *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand) isoliert und untersucht. So sollen beteiligte Gene gefunden und molekular verstanden werden (Abb. 1).
- Eine Pflanzenart mit der erstaunlichen Fähigkeit, Zink und Cadmium in Konzentrationen zu akkumulieren, die hundert- bis tausendfach höher sind als bei normalen Pflanzen, ist Gegenstand zahlreicher Studien. Diese Spezies zählt zu den metallhyperakkumulierenden Pflanzen und heißt *Arabidopsis halleri* (Hallersche Schaumkresse) (Abb. 2), ist also nahe verwandt mit *A. thaliana*.
- Andere Untersuchungen befassen sich mit Gerste als Modell für Getreide, die mit Abstand wichtigsten Nahrungspflanzen. Von besonderem Interesse ist dabei der Transport von Zink, Eisen und Cadmium in den Gerstesamen. Jede Pflanze versorgt ihre Nachkommen, die im Samen befindlichen Embryonen, mit allen für den Start ins selbständige Leben notwendigen Stoffen, also auch den Mikroelementen. Wie das geht, will die Arbeitsgruppe Clemens in Bayreuth herausfinden.

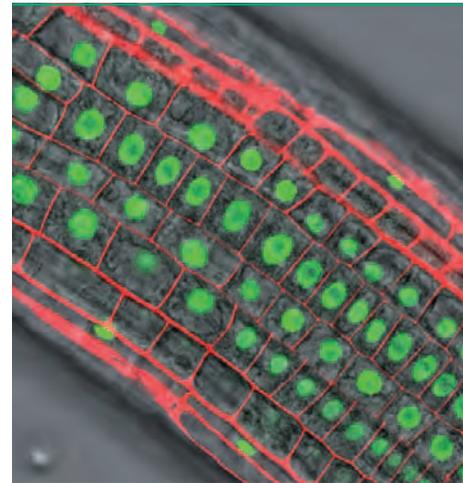
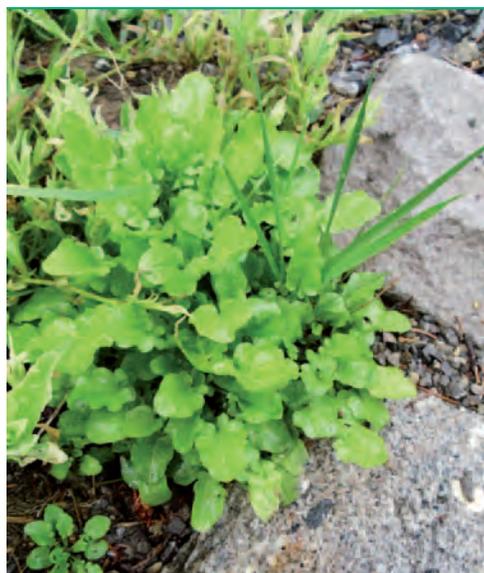


Abb. 1: Die Lokalisierung eines Proteins der Metallhomöostase im Kern von *Arabidopsis thaliana*-Wurzelzellen. Das Protein wurde in transgenen Pflanzen fusioniert, mit dem Green Fluorescent Protein exprimiert und leuchtet grün. Die Zellwände sind durch Propidiumiodid rot gefärbt (Mikroskopische Aufnahme: Michael Weber).

Abb. 2: Von besonderem Interesse für die Erforschung des pflanzlichen Metallhaushalts: die Hallersche Schaumkresse (*Arabidopsis halleri*) (Foto: Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie).

AUTOR



Prof. Dr. Stephan Clemens ist Inhaber des Lehrstuhls für Pflanzenphysiologie an der Universität Bayreuth.

Abb. 3: Dr. Michael Weber, Akademischer Rat am LS Pflanzenphysiologie, bei der Elementanalytik mittels *Inductively coupled plasma optical emission spectroscopy* (ICP-OES). In Pflanzenproben werden so nach Säureaufschluss die Konzentrationen wichtiger Metalle wie Eisen oder Zink bestimmt (Foto: Christian Wißler).

VERGLEICHE ZWISCHEN MUTANTEN UND WILD-TYP-PFLANZEN

Metalle liegen in ionischer Form in der Bodenlösung vor und werden als Ionen in Zellen aufgenommen. Da geladene Teilchen und Moleküle die Membranen, die eine jede Zelle umschließen, nicht passieren können, ermöglichen spezielle Transporter-Proteine die Aufnahme. In der Zelle müssen Metallionen dann entweder in Proteine eingebaut oder in die Zellorganellen transportiert und dort in ihre Zielmoleküle eingebaut werden. Zudem müssen die Mikroelemente aus der Wurzel in alle oberirdischen Organe über zum Teil sehr große Distanzen transportiert werden. Auch müssen die Konzentrationen möglichst konstant gehalten werden – selbst dann, wenn das Angebot im Boden je nach Standort und Bedingungen stark schwankt. Dies ist deshalb unerlässlich, weil auch essentielle Mikroelemente getreu der Erkenntnis von Paracelsus – „Alle Dinge sind Gift, und nichts ist ohne Gift“ – sehr leicht toxisch wirken können, wenn die Konzentrationen nur etwas über den physiologisch erforderlichen liegen. Im Bayreuther Labor für Pflanzenphysiologie wurden zahlreiche Mutanten isoliert, die in Gegenwart erhöhter Zink-Konzentrationen größere Wachstumsschwierigkeiten haben als Wildtyp-Pflanzen. Die betroffenen Gene werden isoliert und ihre Funktion studiert. Darüber können molekulare Mechanismen der Zinkhomöostase aufgeklärt werden.

WELTMEISTER IN DER AKKUMULATION VON METALLEN

In Pflanzen, wie auch im menschlichen Körper oder in den meisten anderen Organismen, liegt der Zinkgehalt bei etwa 50 Mikrogramm pro Gramm Trockengewicht, also bei rund 0.005 Prozent des Trockengewichts. Metallhyperakkumulierende Pflanzen wie *Arabidopsis halleri* erreichen weit höhere Gehalte. Feldstudien im Rahmen eines DFG-Schwerpunktprogrammes zusammen mit Kooperationspartnern an der Ruhr-Universität Bochum (Prof. Ute Krämer und Mitarbeiter) haben Werte von bis zu 5 Prozent des Trockengewichtes ergeben. Dies ist, wie es aussieht, ein Weltrekord. Die höchsten Cadmiumkonzentrationen, die im Rahmen dieser Studien an natürlichen Standorten gemessen wurden, liegen mit bis zu 0,3 Prozent ebenfalls um mehrere Größenordnungen über denen normaler Pflanzen.

Die molekulare Analyse dieser Eigenschaften bietet die Chance, Mechanismen der Metallaufnahme und -speicherung an einem extremen Beispiel aufzuklären. Außerdem lassen sich an diesem Modell die Wege der Evolution von Anpassungsleistungen sehr gut studieren. Die Untersuchungen in Bayreuth sowie Arbeiten weiterer Forschungsgruppen haben ergeben, dass zahlreiche Gene der Metallhomöostase in metallhyperakkumulierenden Pflanzen anders reguliert sind als sonst in Pflanzen.

UNTERSUCHUNGEN ZU NICOTIANAMIN

Zinktransporter zum Beispiel sind in *A. halleri* nicht nur aktiv, wenn Zinkmangel herrscht, sondern jederzeit. Dies geht zurück auf während der Evolution selektierte Veränderungen in der Kopienzahl und der Regulation entsprechender Zinktransporter-Gene.³ In Bayreuth wurde dies vor allem für die Synthese von Nicotianamin nachgewiesen. Dieses Molekül ist in Pflanzenzellen wichtig für die Pufferung der schwankenden Zink- und Eisengehalte. Nicotianamin sorgt außerdem für die Mobilität dieser Metalle in der Pflanze. Ohne diesen Stoff gelangen auch weniger Mikroelemente in den Samen. Pflanzen wie *A. halleri* synthetisieren besonders viel Nicotianamin in ihren Wurzeln und erreichen so mehr Transport über lange Strecken in die Blätter hinein.⁴



EISEN UND ZINK: STUDIEN ZU GETREIDEKÖRNERN

Wenn wir durch den Verzehr von Getreideprodukten, Hülsenfrüchten oder anderen Gemüsen Eisen und Zink aufnehmen, ist für uns nicht nur wichtig, wie hoch die Mikroelementgehalte sind (Spinat ist übrigens entgegen hartnäckiger Gerüchte und der erstaunlichen Effekte auf Popeye nicht besonders reich an Eisen). Es kommt ebenso darauf an, wo und in welcher chemischen Umgebung sich diese Mikroelemente in den von uns konsumierten pflanzlichen Organen befinden. Nur etwa 5 Prozent des aufgenommenen Eisens wird in die Darmzellen hineintransportiert. Der Rest wird von den Transportern nicht ‚erkannt‘, da sich das Eisen in Komplexen mit anderen in der Nahrung enthaltenen Molekülen befindet. Vollkornmehl enthält mehr Eisen und Zink als weißes Mehl, da die Mikroelementkonzentrationen in den äußeren Schichten des Korns größer sind als im stärkehaltigen Teil, dem Endosperm.

Im Dienste einer besseren Mikroelementversorgung ist es notwendig zu verstehen, welche molekularen Prozesse verantwortlich sind für die Beladung von Getreidekörnern mit Eisen und Zink. In Bayreuth werden diese Prozesse in der Gerste analysiert, die genetisch sehr viel besser zugänglich ist als der für die Ernährung wichtigere Weizen. Untersuchungen der genetischen Vielfalt haben dabei ergeben, dass Gerstesorten sich in den Mikroelement-Konzentrationen der Körner stark unterscheiden. In der Zusammenarbeit mit internationalen Partnern können die Orte der Akkumulation verschiedener Mikroelemente in



Abb. 4: Christiane Meinen (re.), Technische Assistentin am LS Pflanzenphysiologie, erklärt Andrea Monroy Licht (li.), Gastdoktorandin von der Universidad de Cartagena in Kolumbien, die Bedienung des Gaschromatographie-Massenspektrometers. Mit dieser Methode lassen sich für die Metallhomöostase wichtige Moleküle, zum Beispiel organische Säuren, quantifizieren (Foto: Christian Wißler).

einem Samen bestimmt werden (Abb. 5), wobei hochauflösende physikalische Verfahren wie die durch Partikelbeschuss ausgelöste Röntgenfluoreszenz (micro-PIXE in der englischen Abkürzung) zum Einsatz kommen. Auch die Bindungsumgebung der Mikroelemente wird in Sorten mit kom-

„HUNDERTE VON GENEN UND PROTEINEN WIRKEN ZUSAMMEN, UM IN JEDER ZELLE, IN JEDEM GEWEBE UND IN JEDEM ORGAN FÜR DIE RICHTIGE ZINK-KONZENTRATION UND -VERTEILUNG ZU SORGEN.“

trastierenden Gehalten analysiert. In Zukunft wird es hoffentlich möglich sein, auch die diesen Unterschieden zugrundeliegenden Genvarianten zu identifizieren und so die Züchtung von Getreide voranzubringen, das zu einer besseren Mikroelementversorgung beiträgt.

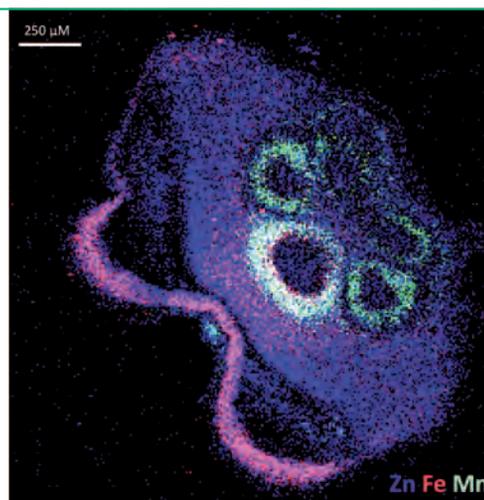
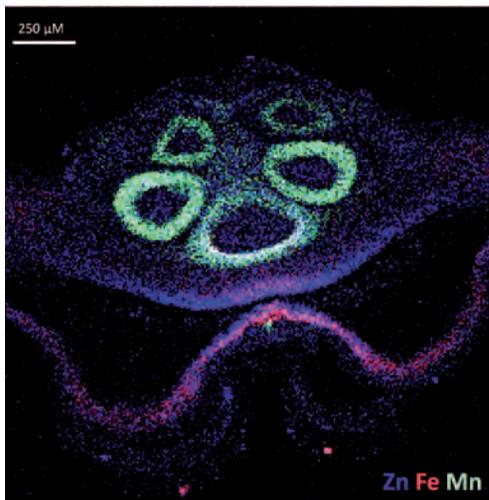


Abb. 5: Die Mikroelemente Zink, Eisen und Mangan in einem geschnittenen Korn: li. in einer Gersten-Sorte mit geringer Akkumulation, re. in einer Gersten-Sorte mit stärkerer Akkumulation (Micro-PIXE-Aufnahme: Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie in Kooperation mit dem Jozef Stefan Institut, Ljubljana, Slowenien).

- 1 M. G. Palmgren et al.: Zinc biofortification of cereals: problems and solutions, Trends in Plant Science (2008), 13: 464–473, 10.1016/j.tplants.2009.01.001.
- 2 S. Clemens et al.: Plant science: the key to preventing slow cadmium poisoning, Trends in Plant Science (2013), 18, 92–99, doi: 10.1016/j.tplants.2012.08.003.
- 3 M. Hanikenne et al.: Hard selective sweep and ectopic gene conversion in a gene cluster affording environmental adaptation., PLoS Genetics (2013), doi:10.1371/journal.pgen.1003707.
- 4 U. Deinlein et al.: Elevated nicotianamine levels in Arabidopsis halleri roots play a key role in Zn hyperaccumulation (2012), Plant Cell, 24, 708–723, doi: 10.1105/tpc.111.095000.



■ ALFONS WEIG

Molekulargenetische Analysen

WAS FORSCHUNGSRICHTUNGEN VERBINDET – VON DER PHYSIOLOGIE BIS ZUR ÖKOLOGIE

■ Moderne molekulargenetische Technologien kommen zunehmend auch bei Analysen von Freilandproben zum Einsatz. Im Keylab Genomanalytik & Bioinformatik wurden zum Beispiel Organismengemeinschaften in Biofilmen analysiert, die sich in Bächen der Fränkischen Schweiz gebildet hatten. Die farbigen Balken zeigen die relative Häufigkeit von Organismengruppen in verschiedenen Proben an (Foto: Lili Nahapetian, Grafik: Alfons Weig).

Wie viele Arten von Lebewesen gibt es auf unserem Planeten? Welche sind vom Aussterben bedroht oder bereits gefährdet? Wie reagieren Lebewesen auf die zunehmende Belastung durch Chemikalien und andere menschengemachte Stoffe? Wie reagieren Ökosysteme auf menschliche Aktivitäten in Landwirtschaft und Industrie? Diese Fragen stellen sich nicht nur Wissenschaftler, Landwirte und Gewerbetreibende, sie betreffen heute die Gesellschaft insgesamt.

Auch wenn sich Lebewesen in ihrer Form, Größe und Gestalt erheblich unterscheiden, arbeiten sie alle mit ähnlichen zellulären Maschinerien, um zu wachsen und sich zu vermehren. Die größte Gemeinsamkeit aller Organismen ist der genetische Bauplan in Form der Erbsubstanz (der DNS, oder bei einigen Viren der RNS). Hier ist die Anweisung für den Aufbau von Zellbestandteilen, beispielsweise der Proteine, gleichsam in einer Bibliothek hinterlegt. Für die Forschung ist das Vorkommen der Erbsubstanz in allen zellulären Organismen natürlich ein Glücksfall, denn dadurch können analytische Verfahren und Geräte in allen biowissenschaftlichen Disziplinen eingesetzt werden. Während in vielen Laboren der Biowissenschaften die einfachen Techniken der DNS-Analyse heute zur Routine gehören, gibt es auch analytische Verfahren, die für viele Bereiche der molekulargenetischen Forschung unentbehrlich, aber nur mit größeren und wesentlich teureren Geräten durchführbar sind.

Deshalb hat die Universität Bayreuth vor rund einem Jahrzehnt auf ihrem Campus das zentrale Labor für „Genomanalytik & Bioinformatik“ eingerichtet. Es berät und unterstützt Forschende und Studierende aus verschiedensten biowissenschaftlichen Disziplinen dabei,

- das beste Analyseverfahren für ihre jeweilige Fragestellung auszuwählen,
- wissenschaftliche Experimente zu konzipieren und durchzuführen und
- die Daten anschließend nicht nur auszuwerten, sondern auch hinsichtlich der Fragestellung zu evaluieren.

Die folgenden Beispiele geben einen Einblick in die vielfältigen Forschungskompetenzen und Arbeitsbereiche dieses Keylab.

HOCHDURCHSATZ-SEQUENZIERUNGEN

Das komplette Genom des Menschen oder einer Pflanze wie der Ackerschmalwand zu entschlüsseln, hat jeweils rund zehn Jahre gedauert und schätzungsweise 3 Mrd. Dollar (Mensch) bzw. 100 Mio. US-Dollar (Pflanze) verschlungen. Inzwischen wurden aber äußerst leistungsfähige DNA-Sequenzierungstechniken entwickelt, die es heute erlauben, vergleichbare Genome innerhalb weniger Wochen zu entschlüsseln – und dies für weniger als 10.000 Euro. Der Trend zu immer günstigeren Analysen scheint sich auch in Zukunft fortzusetzen. Diese Hochdurchsatz-Sequenzierungen – sie werden auch als *Next Generation Sequencing* (NGS) bezeichnet – liefern mittlerweile mehrere Tera-Basen Sequenzinformation (1.000.000.000.000 Basen) pro Lauf. So wäre es theoretisch innerhalb weniger Tage möglich, mit einem Analyselauf das gesamte menschliche Genom mehrere hundert Male gleichzeitig zu analysieren. In der Praxis hingegen werden die Geräte meist dazu genutzt, um weniger komplexe Proben zu analysieren, dafür aber mehrere Proben parallel. Das Keylab Genomanalytik & Bioinformatik arbeitet für derartige Projekte mit externen Firmen zusammen, die die Sequenzierungen auf ihren Großgeräten durchführen. Die Probenvorbereitung sowie die Auswertung und Interpretation der Daten geschieht in solchen Fällen aber im Keylab auf dem Bayreuther Campus.



Abb. 1: Hochleistungsfähige Rechner ermöglichen die Analyse von *Next Generation Sequencing*-Daten (Foto: Christian Wißler).

Keylab Genomanalytik & Bioinformatik

Das Keylab ergänzt mit ausgewählten Analyseplattformen die molekulargenetische Forschung in den verschiedenen biologischen Disziplinen an der Universität Bayreuth – von der Ökologie bis zur Physiologie, von der Grundlagen- bis zur angewandten Forschung. Dazu werden Nukleinsäure-basierte Analysen auf eigenen Großgeräten durchgeführt oder bei Bedarf mit Analysen bei externen Firmen ergänzt. Anschließend werden sie mit der im Keylab vorhandenen Bioinformatik-Infrastruktur ausgewertet. So trägt das Keylab dazu bei, dass Forschungsprojekte mit modernsten molekulargenetischen Verfahren auf dem Campus effizient bearbeitet werden können.

GLOSSAR

Genom: die gesamte DNS-Sequenz (Erbsubstanz) eines Organismus

Gen: kleinste Funktionseinheit eines Genoms, codiert den Bauplan für ein bestimmtes Protein und enthält Regulationsfunktionen für dessen Ausprägung

Transkriptom: die Gesamtheit der transkribierten (aktiven) Gene

Eukaryontische Mikroorganismen: z.B. Einzeller, Pilze und andere mikroskopisch kleine Organismen (nicht nur Tiere und Pflanzen)

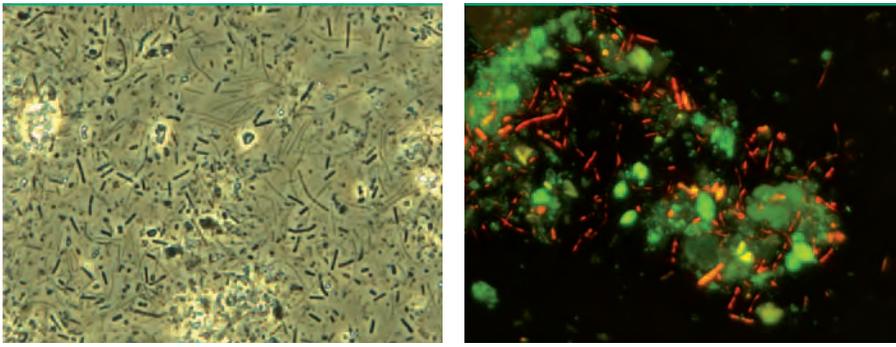


Abb. 2: Biogasbildende Gemeinschaft von Mikroorganismen. Links: lichtmikroskopisches, rechts: fluoreszenz-mikroskopisches Bild (Bilder: Agnes Weiss).

ANWENDUNGEN IN BIOPROZESSTECHNIK UND ÖKOLOGIE

Mikroorganismen sind allein schon auf Grund ihrer Größe schwer fassbar. Um sie dennoch zu identifizieren – beispielsweise in Bodenproben, Biofilmen oder Biogasanlagen –, werden seit einigen Jahren kurze, aber für jede Organismenart möglichst eindeutige Genom-Abschnitte analysiert. Diese Sequenzabschnitte sind den Strichcodes auf den Waren im Supermarkt vergleichbar und werden als DNA-Barcodes bezeichnet. Durch Mutation verändern sie sich im Laufe der Evolution. Deswegen sind sie oft zwischen nah verwandten Arten bereits so verschieden, dass anhand dieser

das Keylab Genomanalytik & Bioinformatik in Proben aus Biogasanlagen rund 2.000 unterschiedliche bakterielle Sequenztypen nachgewiesen. Erstaunlicherweise änderte sich die Zusammensetzung der Organismengemeinschaft in den ersten sechs Monaten nach Inbetriebnahme der Biogasanlage signifikant.¹ Diese Erkenntnisse können beispielsweise genutzt werden, um Prozesse in einer Biogasanlage zu optimieren.

- Gemeinsam mit der Arbeitsgruppe von Prof. Christian Laforch (Tierökologie) untersuchte das Keylab die Gemeinschaft von Bakterien und eukaryontischen Mikroorganismen (Algen, Pilzen und einzelligen Tieren) in einem ‚Biofilm‘. Dieser natürliche Belag hatte sich auf Plastikpartikeln gebildet, die einen Monat lang in einem oberfränkischen Bach gewässert worden waren. Es wurden rund 3.000 verschiedene bakterielle und rund 1.000 eukaryontische Sequenztypen identifiziert. Das Besondere: das Organismenspektrum unterschied sich deutlich auf den verschiedenen Arten von Plastik. Wenn also Plastikmüll in unserer Umwelt zersetzt wird, sind daran verschiedenste Lebewesen beteiligt. Diese Erkenntnis eröffnet grundlegende Einblicke zum Beispiel in die Zersetzungswegen von Plastik.

„MIKROARRAYS DER NEUESTEN GENERATION SIND IN DER LAGE, IN NUR EINEM EXPERIMENT VIELE HUNDERTTAUSEND TRANSKRIPTEN GLEICHZEITIG AUSZULESEN.“

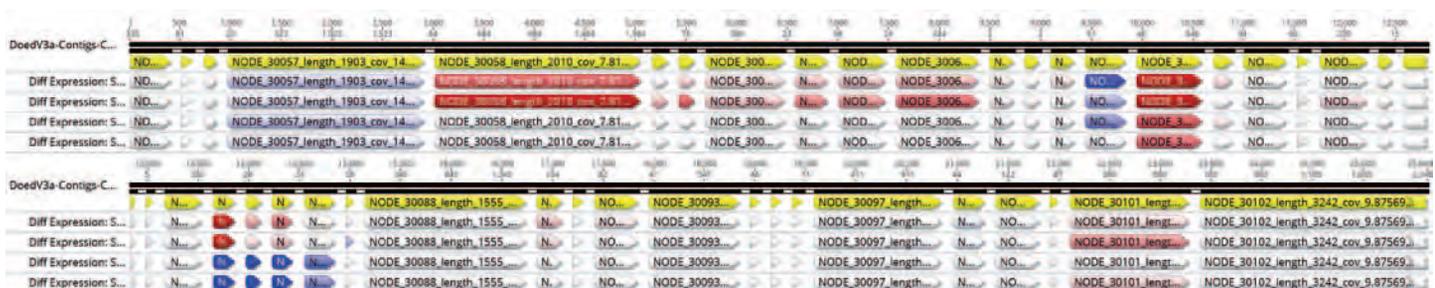
Abb. 3: Dieser Ausschnitt aus aneinerandergereichten Transkripten zeigt farbig (rot, blau) die Werkzeuge an, die in verschiedenen Gewebeproben einer Wildbiene unterschiedlich stark ausgeprägt sind (Bild: Alfons Weig).

Barcode-Sequenzen beschrieben werden kann, aus welchen Mikroorganismen-Arten sich eine Probe zusammensetzt. Dies ist sogar dann möglich, wenn die Probe mehrere tausend unterschiedliche Arten enthält. Zwei Bayreuther Forschungsprojekte machen die Vorteile dieses Verfahrens deutlich:

- In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Ruth Freitag (Bioprozesstechnik) hat

ORGANISMEN BEI ANPASSUNGEN AN IHRE UMWELT BEOBACHTEN

Welche Fähigkeiten helfen einem Organismus dabei, in der Umwelt zu überleben? Wie stellt er sich auf veränderte Lebensbedingungen ein? Welche Fähigkeiten gewinnen oder verlieren Individuen im Laufe ihres Lebens? Diese Fragen lassen sich heute beantworten, indem man sich nicht nur die theoretisch verfügbaren Baupläne (Gene) in einer Bibliothek (Genom), sondern vor allem die tatsächlich genutzten Baupläne ansieht. Die Gesamtheit der *tatsächlich* genutzten Baupläne ist das



Transkriptom. Dies stellt die Summe der zu einem bestimmten Zeitpunkt aktiven Gene dar und kann mit Hilfe der Hochdurchsatz-Sequenzierung entschlüsselt werden. Über die Transkriptomanalyse kann man einen Organismus dabei beobachten, welche und wie viele Werkzeuge – beispielsweise Proteine – er jeweils benötigt und herstellt, um sich auf Bedingungen im Wandel einzustellen (Abb. 3). Dazu zählen die sich ändernden natürlichen Gegebenheiten in der Umwelt ebenso wie Krankheit oder menschliche Einflüsse. Man kann mit dieser Methode verfolgen, wie ein Organismus den ‚Werkzeugkasten‘ seiner Gene nutzt, um beispielsweise Stressfaktoren abzumildern oder ihnen entgegenzuwirken.

Der Vorteil von Transkriptom-Analysen mit Hilfe der Hochdurchsatz-Sequenzierung besteht vor allem darin, dass sie mit jedem Organismus durchgeführt werden können – unabhängig davon, ob bereits früher an ihm geforscht wurde oder ob es sich um einen bislang völlig unbekanntem Organismus handelt. Damit eröffnen sich Forschungsmöglichkeiten mit Organismen, die nicht zu den in der Grundlagenforschung vorwiegend bearbeiteten Modellorganismen gehören.

MICROARRAYS: KOSTENGÜNSTIGE ALTERNATIVEN ZUM NEXT GENERATION SEQUENCING

Für die Transkriptom-Analysen setzt das Bayreuther Keylab nicht allein Verfahren der Hochdurchsatz-Sequenzierung, sondern auch Mikroarrays der neuesten Generation ein (Abb. 5). Diese sind technisch sehr ausgereift und verhältnismäßig kostengünstig. Sie sind in der Lage, in nur einem Experiment viele hunderttausend Transkripten gleichzeitig auszulesen und somit die Ausprägung von Genen zu analysieren. So fand das Keylab zusammen mit Arbeitsgruppen an der Universität Haifa und dem US-amerikanischen Joint Genome Institute heraus, wie ein Pilz sich anpasst, um im



Abb. 4: Küstenstreifen am Toten Meer. Der Pilz *Eurotium rubrum* kann sich so anpassen, dass er trotz des hohen Salzgehalts des Wassers darin überlebt (sst).

Toten Meer nicht nur zu überleben, sondern sich in dieser für andere Lebewesen tödlichen Salzlake sogar zu vermehren.² Wie die Transkriptom-Analyse unter anderem offenbart, produziert der im Toten Meer isolierte Pilzstamm bestimmte Transportproteine. Diese können die Ionenkonzentration im Zellinneren beeinflussen und dafür sorgen, dass der Salzgehalt im Zellinneren noch verträglich ist.

ÄNDERN SICH ORGANISMENGEMEINSCHAFTEN?

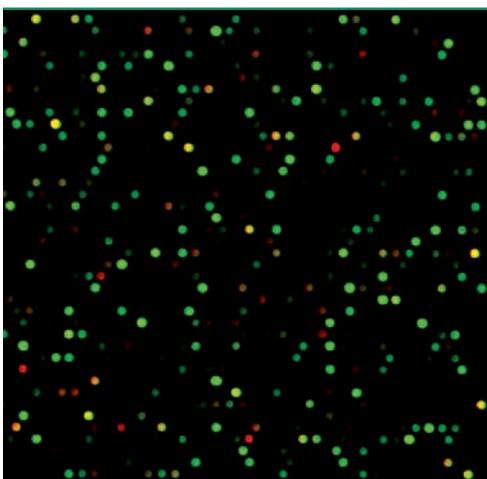
Die Prozesse in einem Ökosystem sind mannigfaltig miteinander vernetzt und dadurch hochdynamisch. Nicht nur der Wechsel der Jahreszeiten, klimatische Veränderungen und die wechselnde Verfügbarkeit von Nährstoffen, sondern auch die vom Menschen eingebrachten Veränderungen können sich auf einzelne Organismen oder die Interaktion zwischen den Organismen – ob förderlich oder hinderlich – auswirken. Die Wissenschaftler im Keylab Genomanalytik & Bioinformatik sind in der Lage, selbst feine Änderungen in der Zusammensetzung einer Organismengemeinschaft zu erkennen. Sie bedienen sich dabei sogenannter *Fingerprinting*-Methoden, die ebenfalls auf der Analyse von DNS beruhen. So konnte in Zusammenarbeit mit der Bayreuther Arbeitsgruppe von Dr. Marie Spohn (Bodenökologie) gezeigt werden, wie sich bakterielle und pilzliche Gemeinschaften in Böden ändern – je nachdem, wie sie mit Kohlenstoff, Stickstoff und Phosphor versorgt werden.³ Die Analysen ermöglichen somit einen weitaus detaillierteren Blick darauf, welche Organismengruppen für die Nährstoffumsetzung im Boden im Wesentlichen beteiligt sind.

Abb. 5: Microarrays der neuesten Generation tragen Hunderttausende von kurzen Gen-Sonden auf einer Fläche von wenigen Quadratzentimetern, mit deren Hilfe die Ausprägung eines Gens gemessen werden kann (Bild: Alfons Weig).

AUTOR



PD Dr. Alfons Weig ist Leiter des Keylab Genomanalytik & Bioinformatik an der Universität Bayreuth.



- 1 N. Weithmann et al.: Process parameters and changes in the microbial community patterns during the first 240 days of an agricultural energy crop digester; in: *AMB Express* 6 (2016) 53, doi: 10.1186/s13568-016-0219-7.
- 2 T. Kis-Papo, A.R. Weig (eq. contr.) et al.: Genomic adaptations of the halophilic Dead Sea filamentous fungus *Eurotium rubrum*; in: *Nature Communications* 5 (2014) 3745, doi: 10.1038/ncomms4745.
- 3 C. Heuck et al.: Microbial nutrient limitation, C:N:P stoichiometry and usage of organic phosphorylated compounds in temperate forest soils; in: *Soil Biology and Biochemistry* 85 (2014) 119-129, doi: 10.1016/j.soilbio.2015.02.029.

Kulturpflanzen für den Klimawandel fit machen

WIE DIE GENETIK DAZU
BEITRÄGT, DASS PFLANZEN
ÜBERFLUTUNGEN ÜBERSTEHEN

Pflanzen können im Allgemeinen ihren Standort nicht verlassen. Sie müssen sich daher auf wechselnde Gegebenheiten in ihrer unmittelbaren Umgebung einstellen, besonders auf starke Schwankungen von Temperatur und Niederschlägen. Weltweit wird daher erforscht, wie Pflanzen auf Dürreperioden oder Überflutung reagieren. Dabei kommen sogenannte Modellpflanzen zum Einsatz, die genetisch gut charakterisiert und zugänglich sind. Das prominenteste Beispiel ist die Acker-Schmalwand (*Arabidopsis thaliana*), deren Genom als erste Pflanzenart sequenziert wurde. Neben den etablierten Modellpflanzen gibt es aber auch Pflanzenarten, die daran angepasst sind, an extremen Standorten, wie etwa in Wüstenregionen oder in Sümpfen, zu überleben. Die molekulare Untersuchung dieser Anpassungsleistungen ist sehr spannend, steckt derzeit aber noch in den Kinderschuhen.

Angesichts des globalen Klimawandels gewinnt dieses Forschungsfeld aber an Bedeutung. Klimamodelle und tatsächliche Beobachtungen lassen befürchten, dass Extremwetterereignisse wie Hitze- und Dürreperioden oder Starkregen in den kommenden Jahren immer häufiger vorkommen. Dies stellt insbesondere die Landwirtschaft vor neue Herausforderungen. Denn Kulturpflanzen zeigen ihre höchsten Erträge nur bei optimalen Wachstumsbedingungen, und jedes Abweichen davon führt zu Ertragsverlusten (Abb. 1). So entwickelt sich eine bedrohliche Lücke: Einerseits steigt der Bedarf an Nahrungsmitteln, weil die Weltbevölkerung zunimmt; andererseits fallen die Erträge infolge extremer Wetterereignisse. Eine bessere Anpassung der Kulturpflanzen an solche Stressfaktoren ist also von größter Bedeutung für die Zukunft der Menschheit.

SAUERSTOFFMANGEL BEI ÜBERFLUTUNGEN

Die Arbeitsgruppe für Pflanzengenetik an der Universität Bayreuth befasst sich mit den Reaktionen von Pflanzen auf Überflutungen, wie sie zum Beispiel nach Starkregen oder beim Frühjahrstauwetter auftreten. Obwohl Pflanzen durch Photosynthese Sauerstoff selbst produzieren, sind ihre unterirdischen Organe wie Knollen und Wurzeln darauf angewiesen, dass sie sich von außen mit Sauerstoff zur Energieproduktion versorgen können. Das Hauptproblem überfluteter Böden besteht für Pflanzen darin, dass in diesem Fall die nötige Sauerstoffzufuhr gestört ist. Denn Gase haben in Was-



Abb. 1: Schäden für die Landwirtschaft durch Überflutungen, hier: Staunässe in einem Rapsfeld (Foto: Angelika Mustroph).

ser eine geringere Diffusionsgeschwindigkeit, und so gelangt weniger Sauerstoff in den Boden.

Umso wichtiger werden Erkenntnisse über die molekularen Mechanismen, mit denen sich Pflanzen an Überflutungen anpassen und ihre Überlebenschancen erhöhen. In Bayreuth untersucht ein Team unter der Leitung von Prof. Angelika Mustroph einzelne Gene, deren Funktionen bisher nicht oder nur wenig bekannt sind. Das Ziel ist es, durch das Ausschalten oder das verstärkte Aktivieren dieser Gene mehr darüber zu erfahren, welche Aufgaben sie übernehmen – zum Beispiel bei der Bewältigung von Sauerstoffmangel. Die dabei gewonnenen Erkenntnisse können dazu beitragen, die Überflutungstoleranz von Kulturpflanzen zu verbessern und sie damit auf die Folgen des Klimawandels vorzubereiten.

WIE BEMERKEN PFLANZEN SAUERSTOFFMANGEL?

In den letzten Jahrzehnten haben Forschergruppen weltweit Erkenntnisse darüber gesammelt, wie Pflanzen auf Überflutung und den damit verbundenen Sauerstoffmangel reagieren. Viele Pflanzen versuchen, ein Durchlüftungsgewebe aufzubauen und damit Sauerstoffmangel im Gewebe zu vermeiden. Wenn dies nicht gelingt, wird der Stoffwechsel an den geringeren Sauerstoffgehalt angepasst, zum Beispiel durch Gärungsprozesse und das Umschalten auf einen ‚Energiesparmodus‘.

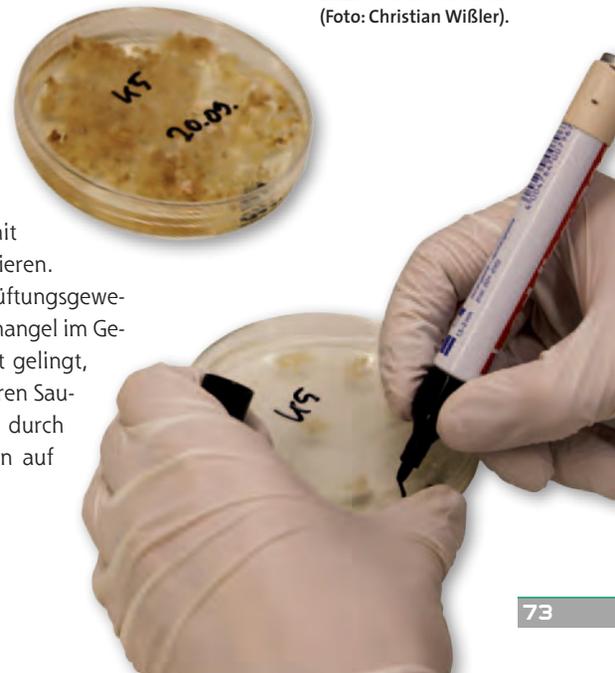


Abb. 2: Beschriftung von Reiskulturen (Foto: Christian Wißler).

AUTORIN



Prof. Dr. Angelika Mustroph ist Professorin für Pflanzengenetik an der Universität Bayreuth.

Aber wie können Pflanzen die sinkende Sauerstoffkonzentration in den Zellen überhaupt bemerken? Dies erfolgt durch ein pflanzliches Messsystem für Sauerstoff, das eine spezielle Gruppe von Transkriptionsfaktoren enthält. Dies sind Proteine, die die Genexpression regulieren können. Proteine der Gruppe-VII-ERF werden bei normalen Sauerstoffkonzentrationen abgebaut. Bei Sauerstoffmangel wird dieser Abbau jedoch zunehmend gehemmt. Infolgedessen reichern sich die Proteine an und sind in der Lage, Gene zu aktivieren, die ihrerseits zu Anpassungsreaktionen führen. Die Arbeitsgruppe um Prof. Angelika Mustroph hat kürzlich bestimmen können, wo diese Proteine in der DNA binden, um die Gene zu aktivieren.¹

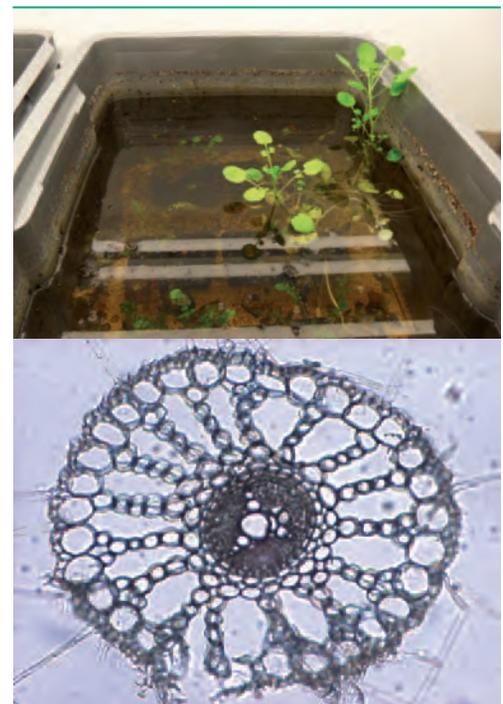
WIE WIRD DAS ÜBERLEBEN GESICHERT?

Weil die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* genetisch sehr gut erforscht ist, eignet sie sich besonders gut dafür, neue Erkenntnisse über allgemeine pflanzliche Anpassungsreaktionen an Sauerstoffmangel zu gewinnen. Wird sie einer Überflutung ausgesetzt, kann sie darin nur einige Tage bis zu wenigen Wochen überleben. Anders verhält es sich mit manchen Sumpf- und Uferpflanzen, die mehrere Monate lang – in einigen Fällen sogar zeitlebens – mit solchen Bedingungen zurechtkommen. Bei der Suche nach verwandten Arten von *Arabidopsis*, die eine hohe Überflutungstoleranz besitzen, wurden die Bayreuther Wissenschaftler auf die Sumpf- und Wasserkressen aufmerksam. Diese Wildpflanzen können monatelang in sumpfigen oder überschwemmten Böden überleben und sogar wachsen.

warten sie ab, bis das Wasser zurückgeht. Dabei fahren sie ihren Stoffwechsel herunter und kommen mit der geringen Energieproduktion bei Sauerstoffmangel aus.

- Wasserkressen dagegen wenden die Vermeidungsstrategie an. Bei einer vollständigen Überflutung wachsen ihre Stängel so schnell, dass sie innerhalb weniger Tage die Wasseroberfläche erreichen und Kontakt zu sauerstoffreicher Luft herstellen können. Der Sauerstoff wird über die aus dem Wasser ragenden Blätter aufgenommen, danach wird er mittels Durchlüftungsgewebe auf die überfluteten Pflanzenorgane verteilt (Abb. 3).

Bemerkenswert an diesen unterschiedlichen Strategien ist, dass sie bei nahe verwandten Arten auftreten. Interessanterweise gibt es weitere Beispiele im Pflanzenreich für beide Strategien, wie etwa unter Ampfer-Arten (*Rumex acetosa* und *Rumex palustris*)³ oder sogar innerhalb derselben Art von Reis.



„KULTURPFLANZEN ZEIGEN IHRE HÖCHSTEN ERTRÄGE NUR BEI OPTIMALEN WACHSTUMSBEDINGUNGEN, UND JEDES ABWEICHEN DAVON FÜHRT ZU ERTRAGSVERLUSTEN.“

Was sind die molekularen Ursachen für eine solche außergewöhnliche Überflutungstoleranz? In einem von der DFG geförderten Projekt geht die Forschungsgruppe um Prof. Angelika Mustroph dieser Frage nach. Die beiden Kresse-Arten sind anschauliche Beispiele für zwei unterschiedliche Mechanismen, Überflutungen zu überstehen:²

- Sumpfkressen verfolgen eine Durchhaltestrategie. Bei einer vollständigen Überflutung

Die Bayreuther Forschungsgruppe wird in Kürze die molekularen Reaktionen der überflutungstoleranten Kresse-Arten durch RNA-Sequenzierung analysieren. Die hohe Verwandtschaft zur Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* wird die Datenauswertung erleichtern und auf molekularer Ebene einen Vergleich zwischen empfindlichen und toleranten Kresse-Arten ermöglichen. Ein weiterer ent-

Abb. 3: Bei Überflutung wachsen die Stängel der Wasserkresse schnell ins Trockene und sorgen für eine Sauerstoffzufuhr aus der Luft (oben). Der Sauerstoff wird über das Durchlüftungsgewebe in der Wurzel verteilt (unten) (Fotos: Angelika Mustroph).



Abb. 4: Doktorandin Jana Müller M.Sc. untersucht überflutete Versuchspflanzen in der Klimakammer, um Stressreaktionen zu untersuchen (Foto: Christian Wißler).

scheidender Forschungsschritt ist das Prüfen von Faktoren, von denen man aufgrund genetischer Analysen vermutet, dass sie die Überflutungstoleranz fördern. Deshalb arbeitet die Bayreuther Forschungsgruppe derzeit daran, einige Kresse-Arten genetisch zu modifizieren. So können bisherige Vermutungen weiter erhärtet werden. Die daraus resultierenden Erkenntnisse lassen sich später für die Züchtung von Pflanzen nutzen, die eine höhere Überflutungstoleranz aufweisen.

VOM LABOR ZUM FELD: REIS UND RAPS VOR ÜBERFLUTUNGSSCHÄDEN SCHÜTZEN

Grundlagenforschung, zum Beispiel an pflanzlichen Anpassungsreaktionen, ergibt nur selten unmittelbar nutzbare Erkenntnisse für die Allgemeinheit. Auf dem Gebiet der Pflanzengenetik gibt es jedoch ein beeindruckendes Beispiel für die erfolgreiche Übertragung von Forschungsergebnissen in die Landwirtschaft. Philippinische und

amerikanische Wissenschaftler haben ein regulatorisches Protein entdeckt, das den Reis bei Überflutungen zum Durchhalten befähigt. Dieses Protein – genannt SUB1A (*submergence 1A*) – wurde durch klassische Kreuzung in häufig genutzte asiatische Reissorten eingeführt. Dadurch verlängerte sich das Überleben von Reis, der nach Starkregen von einer kompletten Überflutung betroffen war, um mehrere Tage. In den letzten Jahren wurde dieser Reis Bauern in Indien, Bangladesch und anderen Ländern zur Verfügung gestellt. Auf Feldern mit diesen neuen Reissorten ließen sich erheblich weniger Ernteverluste feststellen als auf Vergleichsfeldern mit herkömmlichen Sorten: ein deutlicher Vorteil für die Kleinbauern, die auf jedes Reiskorn angewiesen sind.

Im Rahmen des Projektverbunds „BayKlimaFit – Strategien zur Anpassung von Kulturpflanzen an den Klimawandel“ startete in Bayreuth ein neues Forschungsvorhaben, das vom Bayerischen Staatsministerium für Umwelt und Verbraucherschutz gefördert wird. Im Mittelpunkt steht dabei die bedeutende Kulturpflanze Raps, die gegenüber Staunässe und Überflutung extrem empfindlich ist (Abb. 5). Eine Verbesserung der Überflutungstoleranz wäre daher sehr willkommen – gerade im Hinblick auf die wachsende Zahl von Starkregenfällen, die im Zuge des Klimawandels zu erwarten sind. Deshalb werden derzeit verschiedene Rapsorten daraufhin getestet, wie empfindlich sie für Staunässe sind. Weitere Schritte sind die Auswahl von eher empfindlicheren und eher toleranteren Sorten sowie deren molekulare Analyse. Ein Vergleich mit Daten der toleranteren Kresse-Arten wird sich anschließen. Auf diese Weise könnte das Ziel näherrücken, die Staunäsetoleranz der wichtigen Rohstoffpflanze Raps durch Züchtung zu verbessern.



Abb. 5: Raps ist nach 4 Wochen Staunässe erheblich geschädigt (Foto: Bettina Bammer M.Sc.)



Abb. 6: In einem Gewächshaus der Universität Bayreuth überprüft Prof. Dr. Angelika Mustroph die Temperatur für die Anzucht von Raps (Foto: Christian Wißler).

- 1 P. Gasch et al.: Redundant ERF-VII transcription factors bind to an evolutionarily conserved cis-motif to regulate hypoxia-responsive gene expression in Arabidopsis, in: Plant Cell (2016), Vol. 28, No. 1, pp. 160-180, doi: 10.1105/tpc.15.00866.
- 2 A. Mustroph et al.: (Über)leben ohne Sauerstoff. Wenn Pflanzen die Luft ausgeht, in: Biologie in unserer Zeit (2016), Vol. Issue 1, S. 32-40, doi: 10.1002/biuz.201610584.
- 3 H. van Veen et al.: Two Rumex species from contrasting hydrological niches regulate flooding tolerance through distinct mechanisms, in: Plant Cell (2013), Vol. 25, No. 11, pp. 4691-4707, doi: 10.1105/tpc.113.119016.

JULIENNE SCHIEBOLD
GERHARD GEBAUER

Orchideen als Feinschmecker

UNTERIRDISCHE DREIECKSBEZIEHUNGEN SICHERN DIE ERNÄHRUNG MIT TRÜFFELN

Querschnitt durch eine fleischige Wurzel der Übersehenen Ständelwurz *Epipactis neglecta*. Die Wurzelrinden-Zellen sind prall gefüllt mit zusammengeknäuelten Hyphen (sog. ‚Pelotons‘) des Hohltrüffels *Tuber excavatum*, wie molekularökologische Untersuchungen zeigten. Der Maßstabsbalken entspricht 100 Mikrometer (Foto: Julienne Schiebold).
Kleines Bild: Ausschnitt aus einem Blütenstand der Übersehenen Ständelwurz (Foto: Florian Fraaß, Naturfotograf/Bad Berneck).

In vielen mitteleuropäischen Wäldern leben Pilze und Waldbäume in einer Wurzelsymbiose. Die häufigste Form dieser Symbiose in Wäldern ist die Ektomykorrhiza. Die Hyphen der Pilze umwickeln dabei die Wurzelspitzen der Bäume, ähnlich wie ein Handschuh sich um die Finger einer Hand schließt. So vergrößern Pilzhyphen mit ihrem Myzel, das sich auch weit in den Boden erstreckt, die Oberfläche der Baumwurzeln um ein Vielfaches. Von dieser Verbindung profitieren beide Partner: Die Pilze liefern den Bäumen Wasser und Nährsalze, dafür erhalten sie ihrerseits einen Teil des Zuckers, den die Bäume durch Photosynthese erzeugen.

Weltweit gibt es mehr als 20.000 Pilzarten, die nicht nur mit Bäumen, sondern auch mit anderen Pflanzenpartnern eine Ektomykorrhiza bilden. Einige dieser Pilze sind für den Menschen tödlich giftig, wie beispielsweise der Grüne Knollenblätterpilz. Doch es gibt auch rund 1.000 solcher Pilzarten, die essbare und wohlschmeckende Fruchtkörper produzieren. Diese wachsen bei den meisten Pilzen oberirdisch, können aber auch unterhalb der Bodenoberfläche fruchten. Ein prominentes Beispiel sind die zu den Schlauchpilzen gehörenden Trüffel. Sie sind über ihre Hyphen mit den Wurzeln von Eichen, Buchen und Haselsträuchern verbunden und sichern sich dadurch die Zufuhr von Nährstoffen, die sie für ihr Wachstum benötigen (Abb. 1).

DELIKATESSE TRÜFFEL – AUCH IN BAYERN HEIMISCH

Von den sogenannten Echten Trüffeln – diese gehören der Gattung *Tuber* an – kennt man bislang rund 180 Arten. Die aufgrund ihres kulinarischen Werts wohl bekanntesten Arten sind der schwarze

„TRÜFFEL SIND AUCH IN
OBERFRANKEN AN GEEIGNETEN
STANDORTEN KEINESFALLS SELTEN.“

Périgord-Trüffel (*Tuber melanosporum*) aus Frankreich und der weiße Piemont-Trüffel oder Alba-Trüffel (*Tuber magnatum*) aus Italien. Bevor die unscheinbaren erdigen Knollen zu einer der edelsten Küchenzutaten werden, müssen sie durch den



Abb. 1: Ektomykorrhiza zwischen dem Périgord-Trüffel und den Feinwurzeln der Steineiche (Foto: Laura Martinez-Suz, Royal Botanic Gardens Kew, London).

Trüffelsucher (italienisch: Tartufo) traditionell mithilfe eines speziell ausgebildeten Trüffelschweines oder Trüffelhundes aufgespürt werden. Dank ihres sensiblen Geruchsinns können die trainierten Tiere den starken Geruch der unterirdisch wachsenden Trüffel sehr gut wahrnehmen.

Trüffel sind ein seltenes Gut auf dem Markt und erzielen als kostbare Delikatesse Preise von bis zu 9000 € pro kg. Auch in Bayern kommen Arten der Echten Trüffel (Gattung *Tuber*), wie zum Beispiel der aromatische Sommer-Trüffel (*Tuber aestivum*), vor allem auf kalkreichen Böden vor. Diese Tatsache ist aber weitgehend unbekannt. Alle wild wachsenden Trüffelarten sind in Deutschland durch das Bundesnaturschutzgesetz besonders geschützt. Das Sammeln von Trüffeln wird nur in Ausnahmefällen für Forschungszwecke gestattet. Eine Rote Liste des Bundesamts für Naturschutz unterscheidet zwischen ausgestorbenen, verschollenen, gefährdeten, vom Aussterben bedrohten und extrem seltenen Arten.¹

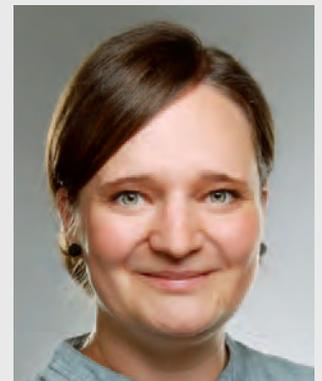
WENN ORCHIDEEN PILZE ‚ANZAPFEN‘

Eine weitere Besonderheit mitteleuropäischer Wälder sind Orchideen. Sie wachsen am Waldboden häufig unter extrem beschränkten Lichtverhältnissen und leben dabei in einer Mykorrhiza mit Ektomykorrhizapilzen. Schon zum Keimen ihrer staubfeinen Samen, die keinerlei Speicherstoffe enthalten, sind Orchideen auf die Verbindung zu einem Pilzpartner angewiesen, der die Keimlinge mit Nährstoffen versorgt.² Die Verbindung bleibt erhalten, auch wenn die Keimlinge sich zu ‚erwachsenen‘ blühenden Orchideen entwickelt haben. Am Labor für Isotopen-Biogeochemie der Universität Bayreuth wurde untersucht, welche Häufigkeitsverteilung der stabilen Kohlenstoff-

AUTOREN

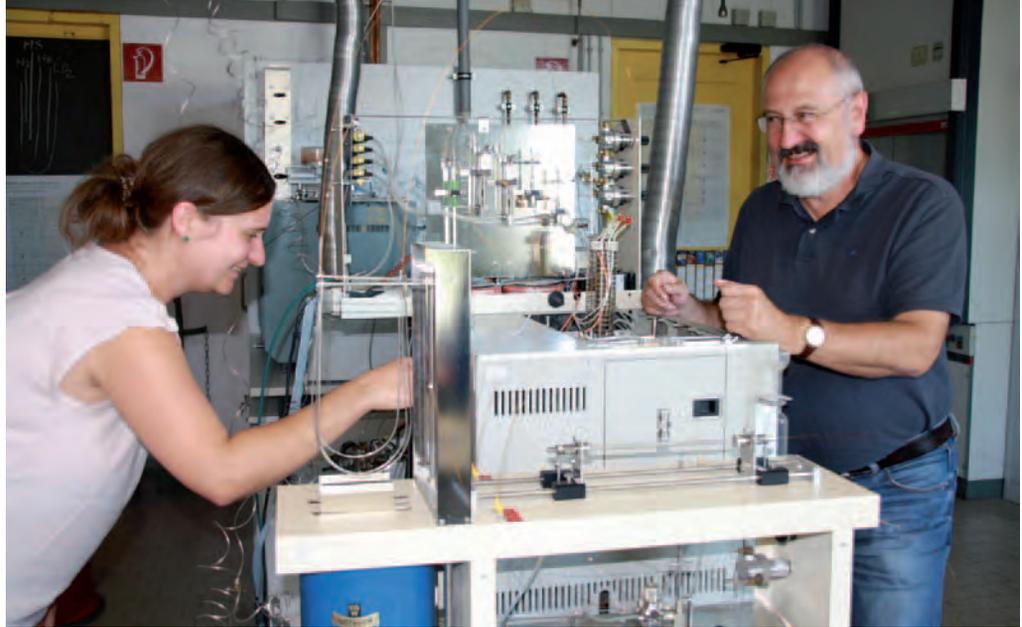


Prof. Dr. Gerhard Gebauer ist Leiter des Labors für Isotopen-Biogeochemie am Bayreuther Zentrum für Ökologie und Umweltforschung (BayCEER), einem Forschungszentrum der Universität Bayreuth.



Julienne Schiebold M.Sc. ist Doktorandin und wissenschaftliche Mitarbeiterin im Labor für Isotopen-Biogeochemie. Sie ist Mitglied der University of Bayreuth Graduate School.

Abb. 2: Laborarbeit an einem Massenspektrometer zur Bestimmung von Isotopenhäufigkeiten. Li.: Julienne Schiebold M.Sc., re.: Prof. Dr. Gerhard Gebauer (Foto: Christian Wißler).



und Stickstoffisotope in Orchideen, ihren Pilzpartnern sowie in anderen Pflanzen ihrer Umgebung vorliegt. Dabei stellte sich heraus, dass grünblättrige Waldorchideen – wie beispielsweise das Weiße Waldvögelein (*Cephalanthera damasonium*) – sich einer ungewöhnlichen Ernährungsweise bedienen:

- Je nach Lichtversorgung am Standort decken sie einen mehr oder weniger großen Teil ihres Kohlenstoffbedarfs durch eigene Photosynthese ab (autotrophe Ernährung).
- Darüber hinaus aber stocken sie ihre Kohlenstoffversorgung auf Kosten ihrer Mykorrhizapilze auf.

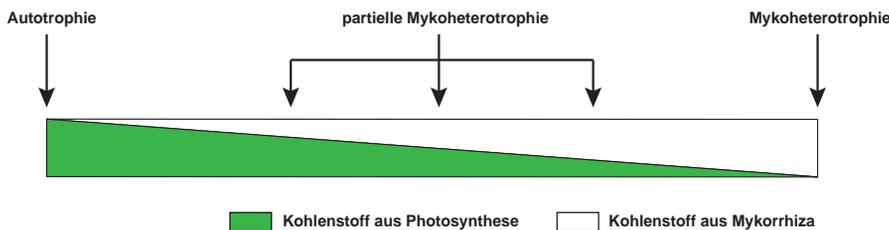


Abb. 3: Die partiell mykoheterotrophe Ernährungsweise vieler grünblättriger Orchideenarten deckt ein weites Spektrum ab: Einige Arten sind fast vollständig autotroph, weil sie ihren Kohlenstoffbedarf aus Photosynthese decken; andere Arten hängen fast vollständig vom Kohlenstoff ab, den sie vom Pilzpartner beziehen, und sind somit fast vollständig mykoheterotroph.⁴

Diese Deckung des Kohlenstoffbedarfs aus zwei grundlegend verschiedenen Herkünften wurde erstmals in Bayreuth entdeckt³ und wird als ‚partiell mykoheterotrophe Ernährung‘ bezeichnet (Abb. 3). Neueste Untersuchungen zeigen, dass diese ungewöhnliche Ernährungsweise bei Orchideen weiter verbreitet ist als bisher angenommen.⁵

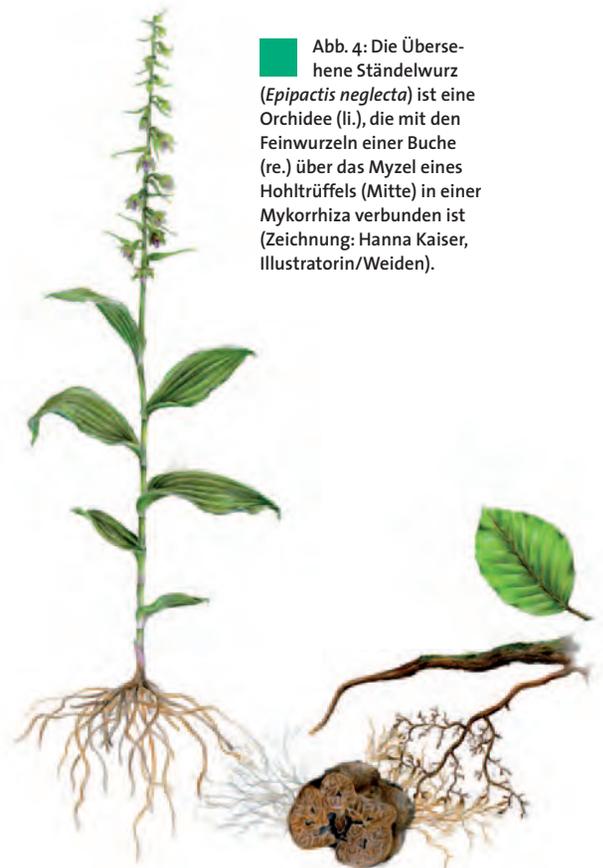
MÉNAGE À TROIS: ORCHIDEEN, PILZE UND BÄUME

In Deutschland heimische Waldorchideen gehen eine Symbiose mit Pilzarten ein, die ihrerseits gleichzeitig mit Bäumen eine Ektomykorrhiza

eingehen (Abb. 4). So fließen Nährstoffe vom Baum über den gemeinsamen Pilzpartner bis zur Orchidee. Die Orchidee wird damit Teil eines Versorgungsnetzwerks und bezieht indirekt über den Pilzpartner Zucker von Waldbäumen. Da sich Pilze in ihrer Kohlenstoff- und Stickstoffisotopenhäufigkeit auffällig von Pflanzen unterscheiden, ist es möglich, dieses Nahrungsnetz anhand der natürlichen Häufigkeit der stabilen Isotope ¹³C und ¹⁵N aufzuklären.

Im Rahmen eines von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) geförderten Projekts⁶ hat eine Bayreuther Forschungsgruppe um Prof. Gerhard Gebauer das Nahrungsnetz der Orchideen-Gattung *Epipactis* (Ständelwurze) untersucht – am Beispiel

Abb. 4: Die Übersene Ständelwurze (*Epipactis neglecta*) ist eine Orchidee (li.), die mit den Feinwurzeln einer Buche (re.) über das Myzel eines Hohltrüffels (Mitte) in einer Mykorrhiza verbunden ist (Zeichnung: Hanna Kaiser, Illustratorin/Weiden).



von Orchideen, die in Wäldern der Fränkischen Schweiz heimisch sind (Abb. 5). Dabei fiel nicht nur die für Waldstandorte typische Anreicherung am schweren Kohlenstoffisotop ^{13}C auf. Einige *Epipactis*-Arten, wie etwa die Schmallippige Ständelwurz (*E. leptochila*), die Übersehene Ständelwurz (*E. neglecta*) und Müllers Ständelwurz (*E. muelleri*), zeigten auch eine ungewöhnlich hohe Anreicherung am schweren Stickstoffisotop ^{15}N . Molekularökologische Untersuchungen führten zu dem überraschenden Ergebnis, dass diese *Epipactis*-Arten ausschließlich mit Pilzpartnern der Gattung *Tuber* vergesellschaftet sind.

ORCHIDEEN ALS WEGWEISER ZU DELIKATES-TRÜFFELN

Die Vermutung lag nahe, dass die von der Orchidee verdauten Echten Trüffel für die ungewöhnlich hohe Anreicherung an ^{15}N verantwortlich sind. Mit dem Pilzsachverständigen der Bayerischen Mykologischen Gesellschaft, dem Tartufaiu Peter Karasch, und seinem Trüffelhund Snoopy suchten die Bayreuther Wissenschaftler die Fundorte der *Epipactis*-Arten erneut auf (Abb. 7). Innerhalb weniger Stunden konnten sie 27 Trüffel-Fruchtkörper an vier Standorten entdecken. Darunter befanden sich neben zahlreichen Exemplaren der Hohltrüffel *Tuber excavatum* auch die Rotbraune Trüffel *Tuber*



rufum, die Winter-Trüffel *Tuber brumale* und die Sommer-Trüffel *Tuber aestivum*. Analysen der natürlichen Isotopenhäufigkeiten zeigten auch hier eine auffällige Anreicherung der Trüffel-Fruchtkörper an ^{15}N . Damit bestätigte sich die Annahme, dass einige *Epipactis*-Arten sich offenbar von Echten Trüffeln ernähren und als „Feinschmecker“ einen Sinn für eine besondere Delikatesse haben.

Wie die Untersuchung zeigt, sind Trüffel auch in Oberfranken an geeigneten Standorten keinesfalls selten. Umso bemerkenswerter ist es, dass bis zum Beginn dieses Forschungsprojekts keine einzige Art der Gattung *Tuber* an den aufgesuchten Standorten kartiert worden war.⁷ Aufgrund ihrer symbiotischen Lebensweise eignen sich einige Orchideen-Arten der Gattung *Epipactis* wohl als Wegweiser zu den begehrten aromatischen Trüffeln.

Abb. 5: Gruppe der Übersehenen Ständelwurz in einem Buchenwald in der Fränkischen Schweiz (Foto: Florian Fraaß, Naturfotograf/Bad Berneck).

Abb. 6: Querschnitt durch einen Fruchtkörper des Winter-Trüffels. Der Maßstabsbalken entspricht 1 cm (Foto: Peter Karasch, Bayerische Mykologische Gesellschaft).

Abb. 7: Pilzsachverständiger und Tartufaiu Peter Karasch mit seinem Trüffelhund Snoopy bei der erfolgreichen Trüffelsuche in einem winterkahlen Buchenwald in der Fränkischen Schweiz. Der Hund gehört der italienischen Rasse Lagotto Romagnolo an, die speziell für die Trüffelsuche gezüchtet wird (Foto: Julienne Schiebold).

- 1 Vgl. www.bfn.de/fileadmin/MDb/documents/RoteListePflanzen.pdf.
- 2 M. Stöckel et al.: Carbon and nitrogen gain during the growth of orchid seedlings in nature, in: *New Phytologist* (2014), Volume 202, Issue 2, pp. 606–615, doi: 10.1111/nph.12688.
- 3 G. Gebauer, G. Meyer: ^{15}N and ^{13}C natural abundance of autotrophic and myco-heterotrophic orchids provides insight into nitrogen and carbon gain from fungal association, in: *New Phytologist* (2003), Volume 160, Issue 1, pp. 209–223, doi: 10.1046/j.1469-8137.2003.00872.x.
- 4 Grafik aus: Vincent S.F.T. Merckx: Mycoheterotrophy: An Introduction, in: ders.: *Mycoheterotrophy. The Biology of Plants Living on Fungi*. New York (2012), p. 1–17, hier: p. 11; deutsch von J. Schiebold.
- 5 Siehe dazu: G. Gebauer et al.: Partial mycoheterotrophy is more widespread among orchids than previously assumed, in: *New Phytologist* (2016), Volume 211, Issue 1, pp. 11–15, doi: 10.1111/nph.13865.
- 6 Für weitere Informationen zu diesem DFG-Projekt über „Partielle Mykoheterotrophie bei Orchideen“: www.bayceer.uni-bayreuth.de/ibg/de/forschung/proj/projekt.php.
- 7 Vgl. <http://brd.pilzkartierung.de>.



■ SIMON TRAGUST
OLIVER OTTI
HEIKE FELDHAAR

Körper-, Nest- und Nahrungshygiene

STRATEGIEN ZUR IMMUNABWEHR AUSSERHALB DES KÖRPERS

■ Betrachtung des Gesundheitszustands
einer Ameisenkolonie (Foto: Peter Kolb).

AUTOREN



Dr. Simon Tragust und Dr. Oliver Otti sind Mitglieder der Forschungsgruppe Populationsökologie der Tiere an der Universität Bayreuth.



Prof. Dr. Heike Feldhaar ist Professorin für Populationsökologie der Tiere an der Universität Bayreuth.

erreger außerhalb des Körpers vermindern. Hierzu gehören die Abgabe antimikrobiell wirksamer Substanzen oder Verhaltensanpassungen, wie das Reinigen der Körperoberfläche oder des Nestes. Wichtig für die Evolution sind die Erbllichkeit und die Variabilität eines Abwehrmerkmals zwischen Individuen. Nur dann kann sich ein solches Merkmal, wie etwa die Zusammensetzung eines antimikrobiellen Sekrets oder auch ein Verhaltensmerkmal, durch natürliche Selektion herausbilden.

WANN LOHNT ES SICH, IN EINE EXTERNE IMMUNABWEHR ZU INVESTIEREN?

Die Annahme liegt nahe, dass Organismen in einer stärker mit Krankheitserregern (Pathogenen) belasteten Umwelt generell eine stärkere Immunabwehr entwickeln. Je mehr Pathogene in der Umwelt vorhanden sind, umso eher lohnt es sich für ein Tier, die direkte Umgebung zu behandeln. Dies gilt allerdings nur unter der Voraussetzung, dass die Umwelt sich nicht allzu oft ändert. Soziale Insekten, die ihre Nester über einen längeren Zeitraum nutzen, behandeln diese deshalb häufig mit antimikrobiellen Substanzen und halten sie dadurch sauber. Hingegen lohnt es sich für die Rattenschwanzlarve einer „Mistbiene“ kaum, den Versuch zu unternehmen, die hygienischen Verhältnisse in ihrer Umwelt zu verbessern. Der natürliche Lebensraum dieser Schwebfliegenlarve ist Jauche. Sie dürfte zwar mit wesentlich mehr Mikroben konfrontiert sein als Ameisen in ihrem Nest – aber sie bewegt sich frei in dieser unappe-

titlichen Suppe und müsste zur externen Abwehr kontinuierlich große Mengen an antimikrobiellen Sekreten abgeben.

Ob Tiere einzeln oder in Gruppen leben, könnte ein zweiter wichtiger Faktor sein, von dem es abhängt, ob sich eine Investition in externe Immunabwehr lohnt. Gerade in großen Kolonien, zum Beispiel von sozialen Insekten, leben viele nahverwandte Individuen auf engstem Raum zusammen. Für eine Ameisen- oder Bienenkolonie bedeutet dies, dass ein eingeschleppter Krankheitserreger sich schnell zwischen den Arbeiterinnen ausbreiten kann. Ein solches Szenario kennen wir von der Ausbreitung von Grippeerregern unter Kindergartenkindern oder zwischen Berufspendlern, die in derselben voll besetzten U-Bahn zusammengepfercht sind. Eine frühzeitige externe Bekämpfung von Erregern könnte sich in diesen Fällen also lohnen. Für diese Vermutung spricht ein Vergleich zwischen den Genomen von sozialen Insekten, wie Ameisen und der Honigbiene, mit den Genomen allein lebender Insekten, wie Fliegen oder allein lebender Wildbienen.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass soziale Insekten ein weniger diverses internes Immunrepertoire haben. Dies zeigt sich in einer vergleichbar geringen Anzahl verschiedener antimikrobieller Peptide, mit denen Bakterien im Körper bekämpft werden können.² Entsprechend der Ausgangshypothese besitzen also staatenbildende Insekten eine so gute externe Immunabwehr, dass die internen Mechanismen etwas weniger wichtig geworden sind.

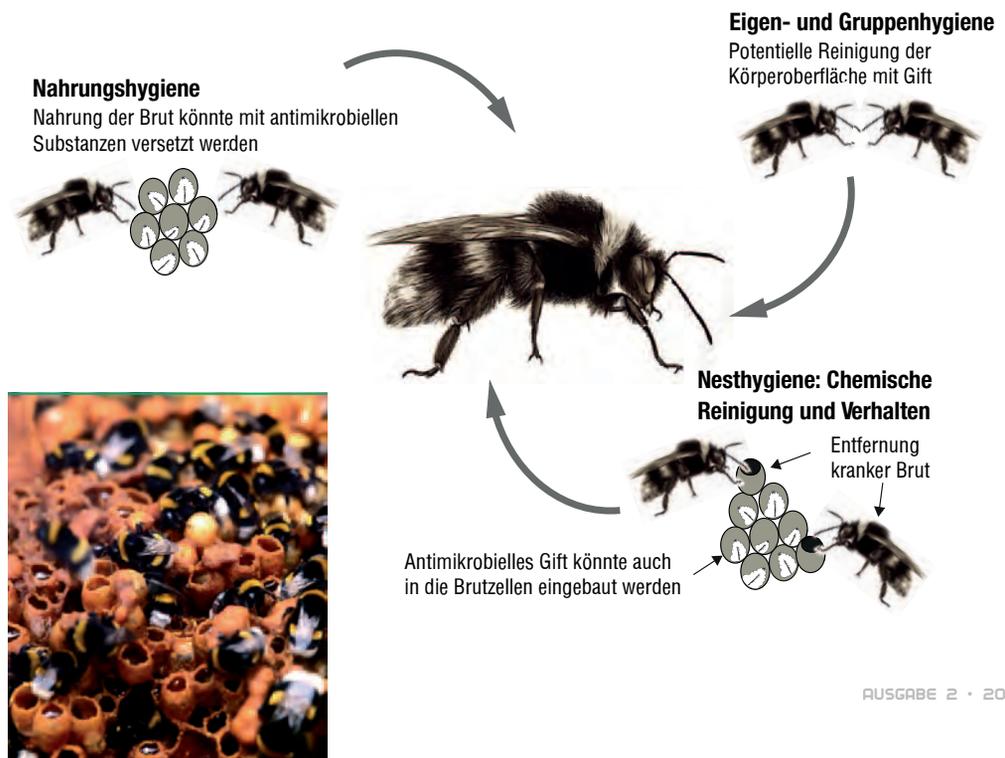


Abb. 2 (rechts): Strategien der externen Immunabwehr bei Hummeln (Grafik: Oliver Otti).

Abb. 3: Hummeln in ihrem Nest (sst).





Die Art der Nahrung, die aufgenommen wird, ist ein dritter wichtiger Faktor, der unter Umständen bewirkt, dass Tiere ein erbliches Merkmal zur externen Immunabwehr ausbilden. Wenn Nahrung gelagert wird oder sich Larven über einen längeren Zeitraum in ihr entwickeln, kann es sich lohnen, die Nahrung zu behandeln und so die schnelle Ausbreitung von Bakterien oder Schimmelpilzen zu verhindern. Dies gilt zum Beispiel für die Larven von Totengräber-Käfern, die sich in Kadavern von Kleinsäugetieren entwickeln. Die Eltern der Larven behandeln die Kadaver mit einem antimikrobiellen Sekret, damit diese nicht verrotten und die Gesundheit der Larven nicht beeinträchtigen.

EXTERNE IMMUNABWEHR BEI SOZIALEN INSEKTEN

Wie hängt die externe Immunabwehr sozialer Insekten mit der Größe ihrer Kolonien zusammen? Mit dieser Frage hat sich die Bayreuther Forschungsgruppe am Beispiel von Hummeln befasst. Hummelköniginnen überwintern alleine und gründen im Frühjahr eine Kolonie. Sie müssen sich also zunächst alleine um die Aufzucht der Larven kümmern und diese mit Nahrung versorgen. Dies führt in einen Zielkonflikt, ob mehr in die Aufzucht des Nachwuchses oder in die Immunabwehr investiert werden soll. Die Untersuchungen haben gezeigt, dass Königinnen im Frühjahr nach der Überwinterung weniger wirksame antimikrobielle Drüsensekrete haben als die später auftauchenden Arbeiterinnen – ein Indiz dafür, dass die Aufzucht des Nachwuchses für die Königinnen Vorrang hatte.

Lässt sich konkret nachweisen, dass eine externe Immunabwehr auf Kosten der internen Immunab-

wehr geht? Zwei Hummelarten, die zurzeit miteinander verglichen werden, könnten darüber Aufschluss geben. Erdhummeln (*Bombus terrestris*) sind in der Lage, Kolonien mit bis zu 600 Arbeiterinnen zu bilden, während Kolonien der Wiesenhumme (*Bombus pratorum*) nur 50 bis 100 Individuen umfassen. Wegen der größeren Kolonien sollten Arbeiterinnen der Erdhumme ein wirksameres Drüsensekret haben und das Wachstum von Bakterien besser hemmen können. Falls sich diese Annahme bestätigt und sich zudem ergeben sollte, dass Arten mit wirksameren Drüsensekreten weniger in ihre interne Immunabwehr investieren, dann wäre dies ein klares Indiz für einen Zielkonflikt.

Ameisenarten der Unterfamilie Formicinae, zum Beispiel rote Waldameisen (*Formica rufa*), verwenden zur Abwehr von Feinden Ameisensäure. Dr. Simon Tragust konnte zeigen, dass die invasive Gartenameise (*Lasius neglectus*) die Ameisensäure auch im Nest nutzt.³ Larven, auf deren Oberfläche Krankheitserreger haften, werden von Arbeiterinnen intensiv gepflegt. Dabei werden die Erreger nicht nur mechanisch entfernt, sondern die Oberfläche der Larven wird gleichzeitig mit Ameisensäure behandelt. Diese sorgt dafür, dass Krankheitserreger abgetötet werden. So verhindern die Arbeiterinnen eine akute und tödlich verlaufende Infektion, aber auch die Ausbreitung virulenter Krankheiten in der Kolonie. Die Ameisensäure dient ihnen als antimikrobielles „Putzmittel“ – ähnlich den vielen Reinigungsmitteln, die wir tagtäglich im Haushalt einsetzen.

Kürzlich hat die Forschungsgruppe um Prof. Heike Feldhaar bei der Rossameise (*Camponotus floridanus*) noch eine weitere Verwendung von Ameisensäure entdeckt. Nach der Nahrungsaufnahme putzen sich die Arbeiterinnen an ihrem Hinterleib. Dabei nehmen sie offenbar auch die Säure aus ihrer Giftblase auf und schlucken sie. Dies hat Folgen für ihren Kropf, der wie bei Honigbienen als Sozialmagen dient und aus dem Nahrung für die Larven wieder hochgewürgt wird. Mit einem pH-Wert von 2 wird der Kropfinhalt fast so stark angesäuert wie der Magen des Menschen. Dies könnte für die Verdauung von Nahrung vorteilhaft sein. Darüber hinaus stellte sich heraus, dass fast alle Bakterien, die möglicherweise mit der Nahrung aufgenommen werden, diesen niedrigen pH-Wert nicht überleben. Die aufgenommene Nahrung wird also mit Hilfe von Ameisensäure nahezu sterilisiert – auch dies ein Beispiel für eine gründliche externe Immunabwehr.

Abb. 4: Rossameisen (*Camponotus floridanus*) mit ihrer Königin, die durch ihren deutlich größeren Körperbau auffällt (Foto: Heike Feldhaar).

„WIE, WANN UND
WO POTENZIELLE
KRANKHEITSERREGER
BEKÄMPFT WERDEN –
DAFÜR SOLLTE JEDES
LEBEWESEN EINE
MÖGLICHT OPTIMALE
STRATEGIE
ENTWICKELN.“

- O. Otti, S. Tragust, H. Feldhaar: Unifying external and internal immune defences, in: Trends in Ecology and Evolution (2014), Vol. 29, Issue 11, pp. 625–634, doi:10.1016/j.tree.2014.09.002.
- S.K. Gupta et al.: Scrutinizing the immune defence inventory of *Camponotus floridanus* applying total transcriptome sequencing, in: BMC Genomics (2016), 16: 540, doi:10.1186/s12864-015-1748-1.
- S. Tragust et al.: Ants disinfect fungus-exposed brood by oral uptake and spread of their poison, in: Current Biology (2013), 23: 76–82, doi:10.1016/j.cub.2012.11.034.



■ CHRISTIAN LAFORSCH
HANNES IMHOF

Mikroplastik im Süßwasser

EINE HERAUSFORDERUNG FÜR WISSENSCHAFT UND GESELLSCHAFT

■ Grosses Bild: Blick von den Bergkämmen im Norden des Gardasees auf Nago-Torbole, Riva del Garda, Arco und den nördlichen Teil des Gardasees, der von steilen Felswänden begrenzt ist; Kleines Bild: Ansammlung unterschiedlicher Kunststoffpartikel, die aus einer Sedimentprobe vom Ufer des Gardasees abgetrennt wurde (Fotos: Hannes Imhof).

Weltweit sind Kunststoffprodukte aus dem Alltag der meisten Menschen nicht mehr wegzudenken. Sie sind leicht, stabil, korrosionsbeständig und sehr haltbar. In der Kunststoffverarbeitung kommen eine Vielzahl von Kunststoffen zum Einsatz, wie etwa Polyethylen, Polypropylen, Polystyrol oder Polyvinylchlorid (PVC). Seit den 1950er Jahren hat sich die weltweite Produktion von Kunststoffen von 1,5 Millionen Tonnen pro Jahr auf 311 Millionen Tonnen im Jahr 2014 erhöht, und ein Ende des Anstiegs ist nicht absehbar. Den größten Anteil an Kunststoffen – rund 40 Prozent – haben Einwegprodukte der Verpackungsindustrie. Infolgedessen fallen insbesondere in den Industrie- und den Schwellenländern immer größere Mengen von Plastikmüll an. Zugleich ist der Anteil von Kunststoffen, die recycelt werden, bis heute relativ gering; im Jahr 2014 waren es nur rund 30 Prozent.¹

„INSBESONDERE IN DEN INDUSTRIE- UND DEN SCHWELLENLÄNDERN FALLEN IMMER GRÖßERE MENGEN VON PLASTIKMÜLL AN.“

Ein Teil dieser Abfälle landet schließlich in Flüssen und Seen – sei es durch unsachgemäße Entsorgung oder über die Abwässer von Industrie und Privathaushalten. Neuere Untersuchungen sagen voraus, dass manche dieser Abfälle die Umwelt noch mehrere hundert Jahre lang verschmutzen werden. Plastikmüll wird nämlich nur sehr langsam abgebaut. Dabei zerfällt Plastikmüll in kleinste Partikel zwischen 5 mm und 1 Mikrometer, die als Mikroplastik bezeichnet werden. Aber nicht allein über solche Degradationsprozesse gelangt Mikroplastik in Seen und Flüsse. Es wird vielen Produkten wie Zahnpasta oder Reinigungsmitteln schon bei der industriellen Herstellung beigemischt und kann dann bei der Benutzung oder nach der Benutzung über Abwässer in die Kläranlagen transportiert werden. Dies gilt auch für Kunststofffasern, die sich beim Waschen aus synthetischer Kleidung lösen. In den Kläranlagen werden die Kunststoffpartikel jedoch nicht abgebaut. Sie werden entweder zusammen mit dem Klärschlamm entfernt, oder sie gelangen direkt in Flüsse oder Seen. Weitere potenzielle, aber noch nicht untersuchte Eintragsquellen stellen beispielsweise in



Abb. 1: Makroplastik, gefunden am Rand von deutschen Binnengewässern. Gut zu erahnen ist, dass der Großteil aus unsachgemäß entsorgtem Plastikmüll besteht (Bild: Joana Kelen, für den Lehrstuhl Tierökologie I der Universität Bayreuth).

der Landwirtschaft, Bauindustrie und im Straßenverkehr verwendete Kunststoffe dar, die über den Wind oder den Abfluss von Regenwasser in Gewässer eingetragen werden können.

Wie verteilen sich die Partikel in den Gewässern und Uferbereichen, welchen Einfluss haben sie auf Ökosysteme? Hierzu gibt es bereits eine Vielzahl wissenschaftlicher Einzeluntersuchungen, aber noch keine umfassenden Daten, die großflächige Auswertungen und Prognosen ermöglichen würden. Denn die Methoden, die bei der Entnahme, Aufbereitung und Analyse von Proben eingesetzt werden, sind immer noch technisch anspruchsvoll, sehr aufwendig und werden je nach Studie sehr unterschiedlich eingesetzt. Folglich sind auch die bisher erzielten Ergebnisse nicht oder nur schwer miteinander vergleichbar.

BAYREUTHER FORSCHUNGSARBEITEN – PILOTSTUDIE ZUM GARDASEE

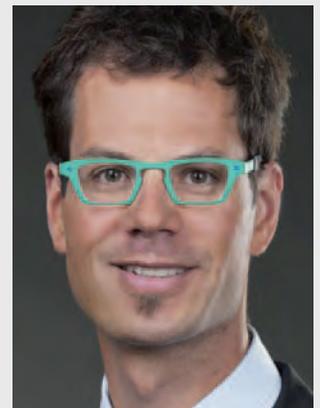
Eine der ersten Arbeitsgruppen weltweit, die sich mit dem Problem von Mikroplastik in Süßgewässern befasst hat, ist die Forschungsgruppe um Prof. Christian Laforsch an der Universität Bayreuth. In den letzten drei Jahren haben die Wissenschaftler ausgewählte Seen und Flüsse in mehreren Bundesländern daraufhin untersucht, wie weit sie durch Plastikpartikel kontaminiert sind, und dabei eng mit den jeweiligen Landesministerien für Umwelt kooperiert.² Die Auswertungen der gewonnenen Daten sind noch nicht abgeschlossen, werden aber erstmals verlässliche Anhaltspunkte dafür bieten, wie stark Süßwasser-Ökosysteme in Deutschland durch Mikroplastik belastet sind.

2013 veröffentlichte die Forschungsgruppe eine vielbeachtete Studie über den Gardasee.³ Sie hatte entdeckt, dass Mikroplastikpartikel in manchen Uferbereichen fast genauso dicht verstreut sind wie an Meeresstränden. Mit Hilfe der Raman-Mikrospektroskopie wurden die Partikel chemisch identi-

AUTOREN



Prof. Dr. Christian Laforsch ist Inhaber des Lehrstuhls Tierökologie I an der Universität Bayreuth.



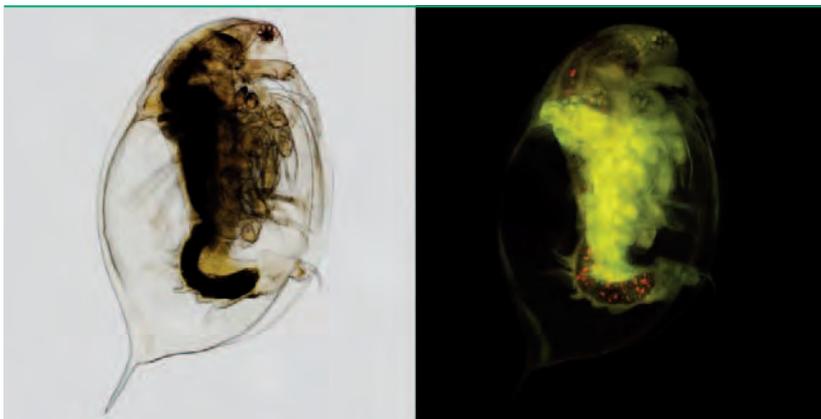
Dipl.-Biol. Hannes Imhof ist Wissenschaftlicher Mitarbeiter und Doktorand am Lehrstuhl Tierökologie I an der Universität Bayreuth.

Abb. 2 (rechts): Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Glanzwurmes (*Lumbricus variegatus*), der zuvor mit rot fluoreszierendem Mikroplastik gefüttert wurde. Diese Partikel sind als leuchtend rote Punkte im Verdauungstrakt zu erkennen, während der Glanzwurm grün leuchtet (Bild: Hannes Imhof).



Abb. 3: Doktorandin Dipl.-Biol. Isabella Schrank und Masterstudentin Lena Löschel bei der Aufbereitung von Sedimentproben mit dem Munich Plastic Sediment Separator. Dieser ermöglicht es, Mikroplastikpartikel zuverlässig von Sediment abzutrennen (Foto: Christian Wißler).

Abb. 4: Li. ist das mikroskopische Bild eines großen Wasserfloh (*Daphnia magna*) zu sehen, re. das gleiche Individuum im fluoreszenzmikroskopischen Bild. Auch dieser Wasserfloh wurde zuvor mit rot fluoreszierendem Mikroplastik gefüttert. Diese Partikel sind als leuchtend rote Punkte im Verdauungstrakt zu erkennen, während der Wasserfloh in leuchtend grün dargestellt ist (Bild: Hannes Imhof).



fiziert und vermessen. Dabei wurden entsprechend ihren Verkaufszahlen die gängigsten Kunststoffsorten, darunter auch Polystyrol und Polyethylen, nachgewiesen. In einer neuen, von der DFG geförderten Studie haben die Wissenschaftler ihre Forschungsarbeiten am Gardasee ausgeweitet und dabei, wie zuvor, mit dem Institut für Wasserchemie der TU München eng kooperiert.⁴ Dabei wurden erstmals auch Farbpigmente analysiert – nämlich einerseits Farbpigmente, die als Farbstoffe in den Kunststoff eingebaut werden, andererseits Farbstoffpartikel, die Kunststoffe nur als Bindemittel enthalten und ursprünglich zum Beispiel als Lacke oder Farben auf verschiedensten Materialien aufgetragen wurden. Ein weiteres, besonders sensibles Messverfahren – die Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma – ergab, dass viele dieser farbigen Partikel Metalle wie Kadmium, Blei und Kupfer enthielten, deren toxische Wirkungen auf den Menschen bereits bekannt sind.

AKTUELLE STUDIEN WELTWEIT

Weltweit gibt es bisher nur eine begrenzte Anzahl von Studien, in denen die Kontamination von Seen mit Mikroplastik untersucht wurde. Zu den Untersuchungsgebieten zählen unter anderem einige nordamerikanische Seen, der Genfer See und der Neusiedler See, der Lago Maggiore sowie weitere oberitalienische Seen. Übereinstimmend stellte sich heraus, dass Ufersedimente deutlich stärker kontaminiert sind als die Wasseroberflächen. In diesen Studien wurden im Uferbereich zwischen 26 und bis zu 2500 Mikroplastikpartikel pro Quadratmeter nachgewiesen. Dabei handelt es sich jedoch um Extremwerte, in der Regel wurden um die 700 Mikroplastikpartikel pro Quadratmeter festgestellt. Darüber hinaus wächst die Zahl der Studien, die sich mit der Verbreitung von Plas-



tikpartikeln in fließenden Gewässern befassen. Zu einigen ‚Flussadern‘ in Westeuropa, Nordamerika und China liegen bereits erste Ergebnisse vor. Allerdings ist es bisher nur in einigen dieser Studien gelungen, sämtliche Plastikpartikel mit spektrometrischen Verfahren zu identifizieren. Dies aber ist erforderlich, um genaue Aussagen über die Zusammensetzung und Herkunft der Verunreinigungen mit Plastik treffen zu können.

TOXISCHE WIRKUNGEN: EIN BREITES FORSCHUNGSFELD

Wie ist die Toxizität von Mikroplastik einzuschätzen? Inwieweit werden Süßwasser-Organismen durch die Partikel geschädigt? Auch mit dieser Fragestellung beschäftigen sich die Wissenschaftler aus Bayreuth. In physikalischer Hinsicht hängt deren Gefährdung insbesondere von der Größe und Form der Partikel ab. Auf der chemischen Seite sind der Kunststofftyp, Farbstoffpigmente und andere Zusatzstoffe relevant, und ebenso auch Schadstoffe aus der natürlichen Umwelt, die von den Plastikpartikeln absorbiert werden können. Weil die Parti-



kel so winzig sind, ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass Wasserflöhe, Würmer, Schnecken, Muscheln, Krebse und Fische sie mit Nahrung verwechseln. Tatsächlich ließ sich bei einigen Tieren die Aufnahme von Mikroplastik nachweisen, wenn sie zuvor mit fluoreszierenden Kunststoffpartikeln gefüttert wurden.⁴ Solche Partikel könnten winzige Verletzungen im Verdauungssystem hervorrufen, aber auch ins Gewebe übergehen und dort zu negativen Effekten führen⁵, wie bereits bei Muscheln gezeigt wurde. Bis aber toxische Wirkungen umfassend nachgewiesen und in ihrem Zusammenhang verstanden werden können, sind intensive und breit angelegte Forschungsarbeiten erforderlich.

Eine aktuelle Untersuchung der Bayreuther Wissenschaftler zeigt deutlich, dass verallgemeinernde Schlussfolgerungen kaum möglich sind. Die Neuseeländische Zwergdeckelschnecke (*Potamopyrgus antipodarum*) zählt zu den häufigsten Wasserschneckenarten in Europa. Erwachsene Tiere dieser Art weisen keine morphologischen Veränderungen auf, selbst wenn ihr Futter eine hohe Konzentration von Mikroplastikpartikeln ohne spezielle Zusatzstoffe wie zum Beispiel Farbstoffe enthält. Auch die Embryonalentwicklung sowie die Entwicklung der Jungtiere scheinen nicht gestört.⁶ Dieser Befund überrascht im Hinblick auf frühere Studien von anderen Forschergruppen, wonach Partikel bestimmter Kunststoffsorten starke toxische Effekte haben. Aber selbst wenn sich eine solche Wirkung bei einzelnen Kunststoffsorten und Tierarten nicht nachweisen lassen sollte – es bleibt die Gefahr, dass Partikel sich in den Nahrungsnetzen weiter ausbreiten und damit letztlich auch den Menschen schädigen könnten.



FAZIT UND AUSBLICK

Hinsichtlich der Belastung von Seen und Flüssen mit Mikroplastik ist ein zunehmendes Problembewusstsein in der Wissenschaft und der Öffentlichkeit festzustellen. Aktuell werden eine Vielzahl von Studien veröffentlicht, die in immer mehr Gewässersystemen Mikroplastik in den verschiedensten Größen nachweisen. Allerdings geben die aktuell vorhandenen Zahlen auf Grund der noch vorhandenen methodischen Schwierigkeiten nur einen Anhaltspunkt über das Ausmaß der Kontamination mit Mikroplastik. Dennoch sprechen die vorhandenen Zahlen dafür, dass Mikroplastik in unseren Gewässern ubiquitär vorhanden ist.

Die Frage, wie sich Mikroplastik in den Gewässern auf deren Bewohner, aber auch den Menschen auswirkt, ist sehr komplex. Die vielfältigen Sorten von Kunststoffprodukten sowie deren unterschiedlichste Zusammensetzungen und Eigenschaften machen es schwer, eine allgemeingültige Antwort zu geben. Einen großen Einfluss haben die Form, die Größe und die chemischen Eigenschaften der Mikroplastikpartikel sowie deren Degradationsgrad in der Umwelt.

Nichtdestotrotz besteht aus gesellschaftlicher Sicht ein erhöhter Forschungsbedarf. Einerseits sollten Methoden entwickelt werden, die in der Zukunft ein standardisiertes Monitoring von Mikroplastik ermöglichen, um die Kontamination der Umwelt im Detail erfassen zu können. Andererseits müssen die Auswirkungen von Mikroplastikpartikeln in Abhängigkeit von Größe, Form und Zusammensetzung untersucht werden, um möglicherweise problematische synthetische Polymere zu identifizieren, die in der Umwelt als Gefahrenstoffe eingestuft werden sollten. Gleichzeitig müssen sinnvolle Strategien zur Reduktion des Eintrags von Mikroplastik in die Umwelt erarbeitet werden. Dazu gehören die Bekämpfung der unsachgemäßen Müllentsorgung, die nachhaltige Nutzung von Kunststoffen, die Substitution durch alternative (Roh-)Stoffe sowie die konsequente Umsetzung der Kreislaufwirtschaft, in der Kunststoff als wertvoller Rohstoff und nicht als Wegwerfprodukt gesehen werden muss.

Abb. 6: Mikroplastik im Spülsaum von Vavvaru, einer einsamen Insel im Indischen Ozean. Die wenigen Einwohner, die hier leben, arbeiten in einer wissenschaftlichen Station. Aber täglich wird Mikroplastik angeschwemmt: Die globale Kontamination durch Mikroplastik betrifft selbst abgelegene Orte fernab von menschlicher Zivilisation (Foto: Hannes Imhof).

Abb. 5 (Mitte): H. Imhof bei der Beprobung der Wasseroberfläche mit dem "MiniManta-Trawl". Dieses wird am Kran des Forschungsschiffes „Kormoran“ der LUBW (Institut für Seenforschung, Langenargen) geführt (Foto: M. Wessels, Institut für Seenforschung).

- 1 Vgl. dazu Plastics Europe 2015: www.plasticseurope.org
- 2 Untersuchungen wurden durchgeführt in Bayern (2014 - 2017), Baden-Württemberg (2015 - 2016), Nordrhein-Westfalen (2015 - 2016), Hessen (2015) und Rheinland-Pfalz (2015).
- 3 H.K. Imhof et al.: A qualitative and quantitative study on microparticles of different size classes, *Water Research*, 98:64-74 (2016), doi: 10.1016/j.watres.2016.03.015.
- 4 K.H. Imhof et al.: Contamination of beach sediments of a subalpine lake with microplastic particles. *Current Biology* (2013), 23(19): R867-R868., doi: 10.1016/j.cub.2013.09.001.
- 5 N. von Moos et al.: Uptake and effects of microplastics on cells and tissue of the blue mussel *Mytilus edulis* L. after an experimental exposure, *Environmental Science & Technology* (2012), 46(20): 11327-11335, doi: 10.1021/es302332w.
- 6 H. K. Imhof and C. Laforsch, Hazardous or not – Are adult and juvenile individuals of *Potamopyrgus antipodarum* affected by non-buoyant microplastic particles?, *Environmental Pollution*, 218 (2016), doi: 10.1016/j.envpol.2016.07.017.



■ CLAUDIA HEMP
ANDREAS HEMP

Grüne Inseln der Evolution

OSTAFRIKANISCHE HEUSCHRECKENARTEN IM WANDEL VON LANDSCHAFT UND KLIMA

■ Waldgebiet in den Nguru-Bergen im Nordosten Tansanias, rund 120 km von der Küste des Indischen Ozeans entfernt.
Vorn: flugunfähige kleine Heuschrecke der Art *Rhainopomma nguruense* (Fotos: Claudia Hemp/Montage: Andreas Gaube).

Wie üppige grüne Inseln erheben sich die bewaldeten Berge Ostafrikas bis zu fast 6000 Metern aus der staubtrockenen Savanne. Ihre natürlichen Bewohner sind heute – sofern sie nicht Flügel besitzen oder sonstwie zur Ausbreitung über weite Distanzen fähig sind – völlig voneinander isoliert. Dies war nicht immer so. In Perioden mit kühlerem und feuchteren Klima muss es bewaldete ‚Landbrücken‘ gegeben haben, die die Bergwälder verbanden. Dies lässt sich besonders gut an der Verbreitung von flugunfähigen Heuschrecken ablesen, die in diesen Wäldern heimisch sind. Diese Insekten finden sich in einer schier überwältigenden Artenvielfalt auf den Bergmassiven. Die meisten dieser Arten kommen jeweils *nur* auf *einer* dieser ‚grünen Inseln‘ vor und sind daher, biologisch gesprochen, endemisch.

Die Entstehung dieser Arten und ihre Verwandtschaftsverhältnisse werfen ein Licht auf die bewegte Landschaftsgeschichte Ostafrikas. Hier liegen nämlich sehr junge Vulkane, zum Beispiel der Kilimanjaro, direkt neben sehr altem Grundgebirge, den Bergen des Eastern Arc, die sich wie eine Perlenkette durch Kenia und Tansania aneinander reihen (Abb. 1). Während der Kilimanjaro nur rund 1 Million Jahre alt ist, wird das Alter der Eastern Arc-Berge auf über 30 Millionen Jahre geschätzt. Dies sind geradezu wissenschaftliche Idealbedingungen, wenn man untersuchen will, inwiefern geographische Isolation die Herausbildung neuer Arten fördert und einen Motor der Evolution darstellt. Zugleich lassen sich zuverlässige Indizien hinsichtlich der Frage gewinnen, wie schnell dieser Motor läuft und die genetische Uhr tickt.¹

Mit dieser Thematik befasst sich seit vielen Jahren eine Arbeitsgruppe, in der Experten aus unterschiedlichen Disziplinen, Universitäten und Forschungseinrichtungen eng kooperieren:

- Universität Bayreuth: Morphologie, Genetik, Ökologie, Taxonomie und Systematik
- Museum Koenig, Bonn: Genetik
- Polnische Akademie der Wissenschaften, Krakau: Cytotaxonomie und Genetik
- Universität Magdeburg: Bioakustik
- Universität Marburg: Genetik

Mit einem interdisziplinären, molekular-ökologischen Ansatz, der klassische Systematik, Taxonomie, Genetik und Ökologie verbindet, untersuchen die Mitglieder dieser Arbeitsgruppe am Beispiel ostafri-



kanischer Heuschrecken grundsätzliche Fragen der Artenvielfalt, Artbildung und Artenverbreitung.

VIEL JÜNGER ALS ERWARTET: ENDEMISCHE ARTEN AUF BERGINSELN

Warum gibt es in den Eastern Arc-Bergen so viele endemische Arten? Bisher herrschte in der Forschung die Ansicht vor, der Artenreichtum sei auf das hohe Alter dieser Berge und ein über Jahrmillionen stabiles Klima zurückzuführen. Sie wird jedoch widerlegt durch Untersuchungen an flugunfähigen Heuschrecken, zum Beispiel aus den Gattungen *Rhainopomma*, *Altiusambilla* und *Usambilla*, die alle zur Gruppe der Lentuliden gehören: Diese Gattungen können nicht älter als 1 bis 2 Millionen Jahre sein, ihre Diversität hat sich erst in einer jüngeren Periode der Evolution herausgebildet. Lentuliden sind nämlich auch auf den jungen Vulkanen Ostafrika mit endemischen Arten vertreten, welche sich folglich nur hier entwickelt haben können.

Zu einem ähnlichen Ergebnis gelangte die Forschungsgruppe bei der Untersuchung von Heuschrecken in den Küstenwäldern Kenias und Tansanias. Diese Wälder existieren vermutlich schon seit vielen Millionen Jahren, bedingt durch ein mehr oder minder stabiles feucht-ozeanisches Klima. Gleichwohl ist der Artenreichtum der hier beheimateten Heuschrecken relativ jung, auch er ist offenbar erst in den letzten 1 bis 2 Millionen Jahren entstanden. Dies lässt sich an der Laubheuschreckengattung *Parapyrrhicia* zeigen, die strikt an Tieflandregenwälder gebunden ist.² Entlang der tansanischen Küste leben mehrere Arten, die offensichtlich in denselben Waldtypen beheimatet

Abb. 1: Die Eastern Arc-Berge, die sich vom Kilimanjaro über die nördlichen und südlichen Pare-Berge sowie die westlichen und östlichen Usambara-Berge bis zum Tiefland am Indischen Ozean erstrecken. Die Usambara-Berge sind die Heimat des nach ihnen benannten „Veilchens“ (Karte: Claudia Hemp).

AUTOREN



Dr. Claudia Hemp ist Wissenschaftlerin am Lehrstuhl Tierökologie II der Universität Bayreuth.



PD Dr. Andreas Hemp ist Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Pflanzensystematik der Universität Bayreuth.



Abb. 2: Laubheuschrecken der Art *Gonatoxia maculata* kurz nach der Paarung (Foto: Claudia Hemp).

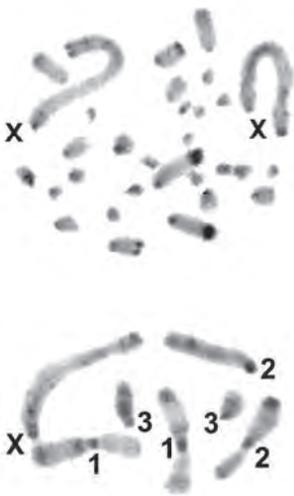


Abb. 3: Chromosomenpräparate von Heuschrecken der Gattung *Gonatoxia*: oben der Art *G. maculata*; unten der Art *G. helleri*, welche die bislang niedrigste nachgewiesene Zahl an Chromosomen bei Laubheuschrecken aufweist (Mikroskopische Aufnahmen: Elzbieta Warchalowska-Sliwa).

sind. Studien zu ihrer akustischen Kommunikation und zum Aufbau der Chromosomen haben ergeben, dass diese Arten eng miteinander verwandt sind. Folglich müssen sie noch sehr jung sein; denn würde es sich um ältere Arten handeln, hätten sie sich während eines sehr langen Zeitraums viel weiter auseinanderentwickelt.

Bei einer weiteren Gattung, *Gonatoxia*, fanden die Forscher heraus, dass die aus Savannengebieten stammende Art *G. maculata* (Abb. 2) einen ursprünglichen Chromosomensatz von 29 Chromosomen bei Männchen und 30 bei Weibchen besitzt, während die in Tieflandregenwäldern verbreitete Art *G. helleri* nur 7 Chromosomen beim Männchen und 8 beim Weibchen aufweist (Abb. 3). Dies ist die niedrigste Chromosomenzahl, die jemals bei Laubheuschrecken nachgewiesen wurde. Bei der Entstehung dieser Art müssen sich dramatische Umbauten im Chromosomensatz abgespielt haben, deren Mechanismen noch weitgehend unbekannt sind.

KLIMAWANDEL UND ARTBILDUNG

Was aber könnte den Anstieg der Biodiversität vor 1 bis 2 Millionen Jahren bewirkt haben? Bei der Suche nach einer Antwort sind vor allem Klimaschwankungen in Betracht zu ziehen. Afrika verzeichnet seit etwa 5 bis 8 Millionen Jahren ein zunehmend trockeneres Klima, das aber durch einzelne feuchte Perioden unterbrochen wurde. Diese Schwankungen ließen die ausgedehnten Waldflächen schrumpfen und begünstigten die Entstehung der ostafrikanischen Savannenlandschaften, wie wir sie heute kennen. Sie bewirkten eine räumliche Vereinzeling von Organismen, die an den Wald als Lebensraum gebunden und aufgrund von Flugunfähigkeit keine anderen Waldgebiete aufsuchen konnten. Eine Chance zur weiteren

Von der zu den Feldheuschrecken gehörenden Gattung *Parepistaurus* (Abb. 3) sind in Ostafrika heute 25 Arten bekannt. Deren Entwicklung, die sich mit genetischen Analysen rekonstruieren lässt, wurden mit Klimaschwankungen in Beziehung gesetzt, die Paläoökologen aus See- und Meeressedimenten ableiten.³ In den letzten 3 Millionen Jahren gab es drei solche Klimaschwankungen (Abb. 4), die jedesmal einen Schub für die Entwicklung neuer *Parepistaurus*-Arten auf den einzelnen Bergen auslösten.

OPTIMIERTE SCHALLWELLEN FÜR DIE PARTNERSUCHE

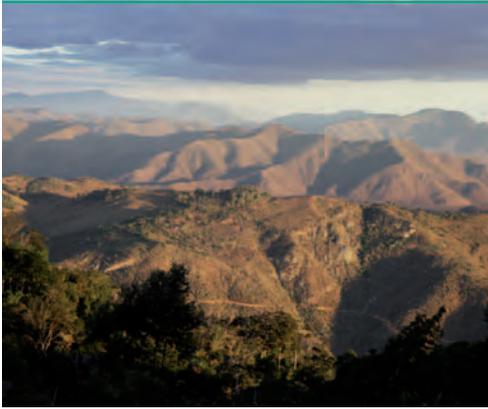
Im Verbund mit Genetik, Ökologie und Klimaforschung kann auch ein spezieller Zweig der Physik – die Bioakustik – neue Erkenntnisse über die Entstehung von Arten zutage fördern. Ein spannendes Beispiel sind Heuschreckengattungen, die zu den afrikanischen Agraeciinen zählen. Genetisch an der Basis des Stammbaumes stehende Gattungen haben lange Flügel und können mit ihrem exponierten Schrillapparat, der sich auf der Oberseite der Flügel befindet, nur Ultraschalltöne hervorbringen. Diese Frequenzen werden im Unterwuchs von Wäldern leicht ‚verschluckt‘. Daher sind paarungsbereite Tiere darauf angewiesen, sich aktiv fliegend fortzubewegen, um ihre Partner zu finden. In den isolierten Usambara-Waldbergen in Tansania machte die Forschungsgruppe jedoch eine überraschende Entdeckung: Bei den hier lebenden endemischen Arten der Gattung *Afroanthracites* (Abb. 5) zeigt sich ein Trend, die Flügel zu verkleinern und gleichzeitig den Schrillapparat unter den Hinterrand ihrer vorderen Brust zu ziehen. So sind sie zwar flugunfähig, aber zugleich in der Lage, im mittelfrequenten – auch für den Menschen hörbaren – Bereich zu singen. Dies hat den Vorteil, dass der Gesang der Männchen leichter durch die Vegetation des Unterwuchses hindurchdringt und für die Weibchen aus weiterer Entfernung wahrnehmbar ist.

BEDROHTE LEBENSRAUME

Wer in den faszinierenden Landschaften Ostafrikas Feldforschungen betreibt, wird Zeuge einer rapide fortschreitenden Waldvernichtung. Wie lange noch werden die Heuschreckenarten, in denen sich eine bewegte Landschafts- und Klimageschichte widerspiegelt, überleben können? Heuschrecken eignen sich als Bioindikatoren für die Qualität eines Le-

„HEUSCHRECKEN EIGNEN SICH ALS BIOINDIKATOREN FÜR DIE QUALITÄT EINES LEBENSRAUMES.“

Verbreitung erhielten sie erst wieder in feuchteren und wärmeren Klimaperioden, in denen die bewaldeten Flächen zunahmten. Eine abermalige Schrumpfung der Wälder förderte dann erneut die Entwicklung separater Arten.



um ein Beispiel aus der Wissenschaftsgeschichte zu nennen – die Forschungsarbeiten Alexander von Humboldts ein herausragendes Beispiel dafür, dass die Systematik der Tiere und Pflanzen unentbehrlich ist, wenn man grundlegende Einsichten in biogeographische, ökologische und klimatische Zusammenhänge gewinnen will. Auch die Erkenntnisse über Evolution, Klimawandel und Landschaftsgeschichte, wie sie durch die intensive Untersuchung ostafrikanischer Heuschrecken gefördert wurden, wären ohne Systematik und Taxonomie nicht möglich gewesen. Diese wissenschaftlichen Disziplinen sind nicht obsolet, sondern bleiben im Verbund mit Genetik und Molekularbiologie mehr denn je aktuell.

Abb. 4 (links): Blick auf die Folgen einer fortschreitenden Waldvernichtung in den südlichen Pare-Bergen Tansanias (Foto: Andreas Hemp).

bensraumes, was der Naturschutz in Deutschland sich schon lange zunutze macht. Dementsprechend will auch die interdisziplinäre Forschungsgruppe, die eine Vielzahl neuer Erkenntnisse über diese Insekten veröffentlicht hat, zugleich auf die akute Gefährdung und Zerstörung mancher Lebensräume in Ostafrika hinweisen. Es ist ihr bisher gelungen, mehr als 120 neue Arten, 12 neue Gattungen und 1 neuen Subtribus zu beschreiben, und ein Ende ist noch nicht in Sicht.

FORSCHUNG IN DER TRADITION ALEXANDER VON HUMBOLDTS

Derzeit liegt das Thema ‚Biodiversität‘ zwar im Trend von Wissenschaft und Politik. Doch die Inventarisierung und Katalogisierung von Tier- und Pflanzenarten in Sammlungen und Herbarien ist deutlich weniger populär. Das Interesse an der Beschreibung von Arten und an einer Untersuchung ihrer Verwandtschaftsverhältnisse lässt nach, es stößt in Wissenschaftskreisen sogar zunehmend auf Unverständnis und Ablehnung. Dabei sind –



Abb. 5: Heuschrecke der Gattung *Afroanthracites* vor dem Hintergrund eines Waldgebiets in den Usambara-Bergen (Fotos: Claudia Hemp).



Abb. 6: In einem stark gefährdeten Küstenwaldreservat in Tansania wurde vor kurzem eine ungewöhnliche Blasenschrecke (*Aerotegmina*) entdeckt. Sie unterscheidet sich sowohl durch ihren Gesang als auch durch ihre Körpergröße von 3 bis 4 cm von den anderen bekannten Arten der Blasenschrecke (1 bis 2 cm). Die Erforschung dieser eigenartigen Heuschrecken könnte einen Beitrag zur nahezeitlichen Vegetations- und Klimageschichte Ostafrikas leisten, aber auch Einblicke in großräumig stattfindende Artbildungsprozesse gewähren.

- 1 Vgl. hierzu u.a. C. Hemp: The Eastern Arc Mountains and coastal forests of East Africa-an archive to understand large-scale biogeographical patterns: *Pseudotomias*, a new genus of African Pseudophyllinae (Orthoptera: Tettigoniidae), in: *Zootaxa* (2016), 4126 (4), pp. 480–490, doi: 10.11646/zootaxa.4126.4.2.
- 2 C. Hemp et al.: Review of the East African species of the phaneropterine genus *Parapyrrhicia* (Insecta: Orthoptera): Secret communication of a forest bound taxon with data on morphology, ecology and chromosomes, including the description of new species, in: *Organisms Diversity and Evolution* (2016), doi: 10.1007/s13127-016-0303-5.
- 3 C. Hemp et al.: Climatic fluctuations and topography as motor for speciation: case study on *Parepistaurus* Karsch, 1896 (Orthoptera: Acrididae, Coptacridinae), in: *Systematic Entomology* (2015), 40(1): pp. 17-34, doi: 10.1111/syen.12092.



Molekulare Farbenspiele

Alljährlich im Oktober wird der Campus der Universität Bayreuth zum Schauplatz für ein Festival der Farben. Das Laub von Bäumen und Sträuchern der verschiedensten Arten beginnt in bunten Farben unter der Herbstsonne zu leuchten. Ein Blick hinter die Kulissen dieser Farbenspiele zeigt: Die gelben, roten und orangenen Pigmente, die einen warmen Kontrast zum Blau des Himmels bilden, entstehen nicht erst in dieser Jahreszeit. Schon seit dem Frühjahr waren sie in den Pflanzen vorhanden, aber erst jetzt treten sie sichtbar hervor.

Die Regisseure dieses Schauspiels sind bestimmte pflanzliche Proteine. Wenn die Tage kürzer werden und die Temperaturen sinken, lösen sie einen Alterungsprozess aus. Die Photosynthese wird zurückgefahren, und das Chlorophyll – das den Blättern im Sommer ein sattes Grün verliehen hat – wird abgebaut. Umso stärker kommen jetzt andere Pigmente zum Vorschein, die ebenfalls zur Photosynthese beigetragen haben: Karotinoide (gelb, orange, rot) und Xanthophylle (gelb). In bestimmten Baumarten entstehen besonders in kalten Nächten auch Anthocyane (rot, violett, blau), die das Blatt vor zu viel Licht schützen. Erst wenn die Blätter absterben, färben sie sich braun. Dabei wissen die Pflanzen aber mit den Substanzen ihres Stoffwechsels zu haushalten. Sie zerlegen das Chlorophyll in viele molekulare Bestandteile, die sie während der Wintermonate in den Zweigen, im Stamm oder den Wurzeln deponieren. Sobald die Frühjahrs Sonne ruft, werden diese Bausteine neu zusammgebaut. Dann sprießen die ersten grünen Blätter hervor, und ein neuer Jahreskreislauf beginnt.