

Max-Planck-Institut für medizinische Forschung Heidelberg

Geschäftsführender Direktor

Prof. Dr. Peter H. Seeburg (bis 4. 6. 1999)
Prof. Dr. Kenneth C. Holmes (ab 5. 6. 1999)

Jahnstr. 29
69120 Heidelberg
Postfach 10 38 20
69028 Heidelberg
Telefon 0 62 21/48 62 71
Telefax 0 62 21/48 64 37
Internet: www.mpimf-heidelberg.mpg.de
E-mail: sekr@mpimf-heidelberg.mpg.de

Wissenschaftliche Mitglieder, Direktoren

Prof. Dr. Kenneth C. Holmes · Prof. Dr. Bert Sakmann ·
Prof. Dr. Wolfhard Almers (bis 28. 2. 1999) · Prof. Dr. Peter H. Seeburg ·
Dr. Winfried Denk (ab 1. 8. 1999)

Weiteres Wissenschaftliches Mitglied

Prof. Dr. Eckhard Mandelkow (ab 15. 6. 1999)

Selbständige Nachwuchsgruppen

Leiter: Dr. Dean Madden · Dr. Harald Hutter

Mitarbeiter

Ende 1999 waren insgesamt 199 Mitarbeiter (einschließlich der Drittmittelbeschäftigten) am Institut tätig, darunter 54 Wissenschaftler; dazu kamen im Berichtsjahr 43 Nachwuchs- und 32 Gastwissenschaftler.

Forschungsthemen im Überblick

Molekulare Mechanismen der Muskelkontraktion; Mechanismen nukleotidabhängiger Enzyme; Struktur und physiologische Bedeutung von Komplexen des Aktins mit Aktin-bindenden Proteinen; Kreatinkinase; Dynamin, Myosin;

Struktur von Filamenten des Zellskeletts; Expression und Charakterisierung von Proteinen des HIV (Holmes)

Molekulare Grundlagen der interzellulären Signalvermittlung im zentralen und peripheren Nervensystem; molekularer Aufbau transmitter- und spannungsgesteuerter Ionenkanäle und Mechanismen der Regulation ihrer Expression (Sakmann)

Mechanismus und Steuerung von Vesikel- und Membrantransport von und zur Plasmamembran, Exo- und Endozytose; Mechanismus der Hormonfreisetzung in Endokrinen Zellen und der Transmitter-Freisetzung in Nervenzellen; methodische Schwerpunkte: elektrophysiologische Messungen, Mikrofluorimetrie, Videomikroskopie und Blitzphotolyse an lebenden Einzelzellen sowie molekularbiologisch-biochemische Ansätze (Almers)

Entwicklung neuer Methoden in der biologischen Mikroskopie (Denk)

Molekularer Aufbau und genetische Regulation glutamatgesteuerter Ionenkanäle im zentralen Nervensystem; Mauslinien mit genetisch manipulierten Glutamatrezeptoren; molekulare Mechanismen für synaptische Plastizität (Seeburg)

Struktur und Funktion von Ionenkanälen (Madden)

Studium von Genen, die für die Zielfindung von Nervenfortsätzen im Nematoden *C. elegans* von Bedeutung sind (Hutter)

Forschungsgruppenleiter:

Prof. Dr. Ulrich Haeberlen

Dr. Wolfgang Kabsch

Dr. Dietmar Manstein

Emeritierte Wissenschaftliche Mitglieder:

Prof. Dr. Wilhelm Hasselbach

Prof. Dr. Karl H. Hauser

Prof. Dr. Dr. Hartmut Hoffmann-Berling

Prof. Dr. Dr. Heinz A. Staab

Auswärtige Wissenschaftliche Mitglieder:

Prof. Dr. Hermann Bujard, Heidelberg

Prof. Dr. Herbert Gutfreund, Bristol/UK

Fachbeirat:

Prof. Dr. Philippe Ascher, Paris/Frankreich

Prof. Dr. Carl-Ivar Brändén, Stockholm/Schweden

Prof. Dr. Jean-Pierre Changeux, Paris/Frankreich

Prof. Dr. Dennis W. Choi, St. Louis/USA

Prof. Dr. Sten Grillner, Stockholm/Schweden (bis 2/1999)

Prof. Dr. Hugh E. Huxley, Waltham/USA

Prof. Dr. Eric R. Kandel, New York/USA

Dr. Arthur Karlin, New York/USA (bis 2/1999)

Prof. Dr. Jeff Lichtman, St. Louis/USA

Prof. Dr. Dino Moras, Illkirch/Frankreich

Dr. David Trentham,

London/UK (bis 2/1999)

Prof. Dr. Stephen J. Smith, Stanford/USA

Prof. Dr. Robert H. Waterston, St. Louis/USA

Institutsgeschichte

Seine Gründung im Jahr 1927 verdankt das Institut der Initiative des Heidelberger Internisten Ludolf v. Krehl, dessen Leitidee es war, die medizinische Grundlagenforschung durch Zusammenarbeit von Klinikern, Physiologen, Chemikern und Physikern in einem Institut zu fördern. Das Institut hat 1930 seine Arbeit mit vier Teilinstituten aufgenommen: Institut für Physik (K. W. Hauser; W. Bothe 1934–1957, Nobelpreis 1954); Institut für Chemie (R. Kuhn bis 1967, Nobelpreis 1938); Institut für Physiologie (O. Meyerhof, Nobelpreis 1922) und Institut für Pathologie (L. v. Krehl).

Nach Krehls Tod 1937 und Meyrhoofs Emigration 1938 wurden deren Institute nicht weitergeführt. Erst 1952 wurde das Institut für Physiologie wiedergegründet (H. Rein; ab 1954 H. H. Weber, emeritiert 1966). Aus dem Institut für Physik ging 1958 das MPI für Kernphysik unter der Leitung von W. Gentner hervor. Nach dem Tod von R. Kuhn 1967 übernahm Th. Wieland dessen Institut (die spätere Abteilung Naturstoff-Chemie). Th. Wieland wurde 1981 emeritiert. Aus dem früheren Institut für Physik sind ebenfalls zwei Abteilungen hervorgegangen: K. H. Hausser (emeritiert 1987) und K. C. Holmes (seit 1968). Die Abteilung Holmes (Biophysik) befasst sich mit der Strukturerrforschung von Proteinen mit den Methoden von Röntgenstrahlbeugung, Kernresonanzspektroskopie und Elektronenmikroskopie. Die Chemie wurde seit 1976 durch H. A. Staab vertreten, der an organisch-chemischen Molekülen die Strukturabhängigkeit chemischer, physikalischer und biologischer Eigenschaften untersuchte. 1989 gründete B. Sakmann (Nobelpreis 1991) die Abteilung Zellphysiologie. Mit dieser Neuberufung begann eine Neuorientierung des Instituts auf die Erforschung der molekularen und zellulären Grundlagen des Lebens. Sakmanns Hauptinteresse gilt der Nervenzelle, die er mit einer Kombination von Molekularbiologie und mikro-physikalischen Messmethoden wie „Patch clamp“ und Mikrofluorimetrie untersucht. Die Neuausrichtung des Instituts wurde durch W. Almers (Abteilung Molekulare Zellforschung) ergänzt, der sich der Erforschung des Membrantransports mit zellbiologischen und mikro-physikalischen Methoden widmete. Seit 1. August 1999 gibt es die neue Abteilung Biomedizinische Optik unter der Leitung von Winfried Denk. Als Nachfolger von H. A. Staab wurde 1996 der Moleku-

larbiologe und Neurobiologe P. Seeburg berufen. Eine Selbständige Nachwuchsgruppe auf dem Gebiet der Strukturforschung leitet Dean Madden. Eine zweite Nachwuchsgruppe zur Neurogenetik von C. elegans wird von H. Hutter geleitet. Die gezielte Ausrichtung des Instituts auf die molekulare und zelluläre Basis aller Lebensprozesse gewährleistet eine verstärkte Zusammenarbeit zwischen den Abteilungen.

Abteilung Biophysik

Direktor: Prof. Dr. Kenneth C. Holmes

Arbeitsgebiete

Molekulare Mechanismen der Muskelkontraktion. Struktur und physiologische Bedeutung der Muskelproteine. Myosin, Aktin und Komplexe des Aktin mit interagierenden Proteinen. – Kleine G-Proteine und ihre Bedeutung für die Dynamik des Zellskeletts. Identifizierung und Charakterisierung von *Dictyostelium discoideum*-Proteinen, die die enzymatische Aktivität von Rho-p21 regulieren. – Charakterisierung von Vesikeltransport und Endozytose in *D. discoideum*. Strukturelle und funktionelle Untersuchung von Dynamin. – Aufklärung der Wirkungsweise von mechanistisch interessanten Enzymen im Hinblick auf die Entwicklung neuer Medikamente: „Induced-fit“-Mechanismus von UDP-N-Acetylglucosamin-enolpyruvyl-transferase (MurA), Metallabhängigkeit der Peptid-Deformylase, „Energy-shuttle“-Kreislauf der Creatin-Kinase, Radikal-Mechanismus der Pyruvat-Format-Lyase. – Methodische Schwerpunkte: Röntgenstrukturanalyse von Proteinkristallen und Faserproteinen, zeitaufgelöste Röntgenbeugung mit Hilfe von Synchrotronstrahlung, Elektronenmikroskopie und rechnerische Bildver-

arbeitung, Klonieren und Exprimieren von Genprodukten in *Dictyostellum discoideum* zum Zwecke der Strukturbestimmung, schnelle Kinetik enzymkatalysierter Reaktionen, gene targeting.

Abteilung Molekulare Neurobiologie

Direktor: Prof. Dr. Peter H. Seeburg

Mechanismen und genetische Kontrolle der Plastizität erregender Synapsen im zentralen Nervensystem. Zellspezifische und konditionale Steuerung der Expression von Schlüssel-molekülen für synaptische Reizleitung, insbesondere ionotroper Glutamatrezeptoren in mutierter Form, mittels transgener Techniken bei Mäusen. Einfluss synaptischer Plastizität auf das Lernverhalten bei Mäusen. Physiologische Bedeutung der RNA-Editierung durch Adenosin-deaminierung im Gehirn und Charakterisierung der die RNA-Editierung katalysierenden Enzyme.

Abteilung Molekulare Zellforschung (bis 28. 2. 1999)

Direktor: Prof. Dr. Wolfhard Almers

Arbeitsgebiete

Mechanismus und Steuerung von Vesikel- und Membrantransport von und zur Plasmamembran, Exo- und Endozytose; Mechanismus der Hormonfreisetzung in Endokrinzellen und der Transmitter-Freisetzung in Nervenzellen; methodische Schwerpunkte: elektrophysiologische Messungen, Mikrofluorimetrie, Videomikroskopie und Blitzphotolyse an lebenden Einzelzellen, sowie molekularbiologisch-biochemische Ansätze.

Wir untersuchen zwei fundamentale Vorgänge im Leben jeder Zelle,

Exozytose und Endozytose. Während der Exozytose verschmilzt die Membran eines Vesikels des Zytoplasmas mit der Zellmembran, der Vesikelinhalt wird in den Extrazellulärraum freigesetzt und die Innenseite der Vesikelmembran kehrt sich nach außen. Die Exozytose läuft fortwährend in Zellen ab: Sie flicken damit Risse in der Zellmembran, beladen dieselbe mit neuen Proteinen und Lipiden und schütten Enzyme, extrazelluläre Matrix und andere Substanzen in den Extrazellulärraum aus (Sekretion). Bei elektrischer Reizung setzen Endokrin- und Nervenzellen zusätzlich Hormone und Überträgerstoffe frei. Neben der Exozytose läuft fortwährend auch eine Endozytose ab. Während dieser stülpt sich Zellmembran nach innen und schnürt sich dort ab, um als endozytischer Vesikel ins Zellinnere zu gelangen. Durch Endozytose holt die Zelle sekretionsbedingt an die Oberfläche gelangte Zellmembran zurück, verinnerlicht Rezeptoren, die Botenstoffen gebunden haben, und vereinnahmt „schrottreife“ Zellmembran-Proteine. Unsere Arbeitsgruppe untersucht die molekularen Mechanismen von Exo- und Endozytose an lebenden Zellen, indem sie Einzelzellen und einzelne Vesikel beobachtet und in physikalischen Messungen charakterisiert.

Aktueller Forschungsschwerpunkt

Beobachtungen an einzelnen sekretorischen Vesikeln in lebenden Zellen

Exozytose steht am Ende mehrerer gekoppelter Ereignisse. Nach derzeitiger Vorstellung werden Vesikel zunächst an die Zelloberfläche transportiert, binden dann an spezifische Zellmembran-Bindungsstellen („Andocken“), und bauen schließlich in mehreren aufeinanderfolgenden Schritten einen Proteinkomplex auf,

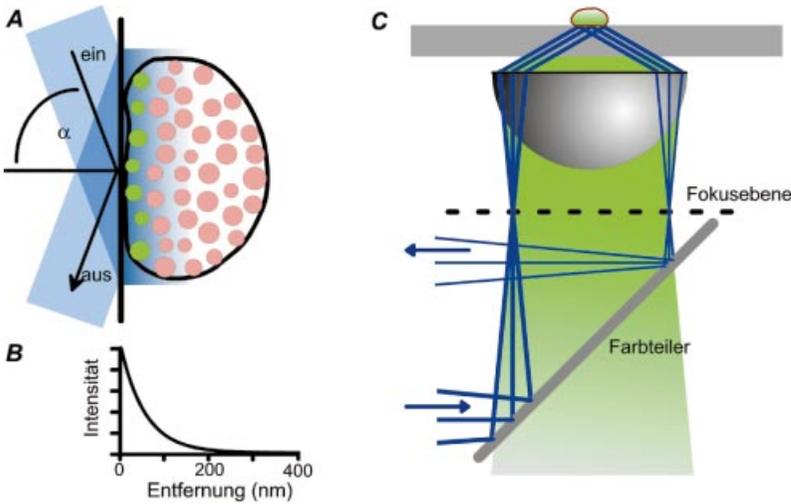


Abb. 1: A) „Evaneszente“ Beleuchtung (blau) durch Totalreflexion schematisch dargestellt. Links das Glasplättchen, rechts die Zelle mit sekretorischen Vesikeln, die nahe dem Glasplättchen grün fluoreszieren. B) Exponentzieller Abfall der Beleuchtungsintensität mit Entfernung von der Grenzfläche. C) Totalreflexion durch Aufsicht. Von oben nach unten: Zelle, Glasplättchen und Objektiv, letzteres vereinfachend durch eine Linse dargestellt. Das Anregungslicht (blau) wird von einem Farbteiler ins Objektiv geworfen und in der hinteren Fokalebene des Objektivs zu einem Punkt fokussiert. Je weiter der Brennpunkt von der optischen Achse entfernt ist, desto flacher der Austrittswinkel des Anregungslichts und desto geringer die Eindringtiefe des evaneszenten Feldes. Bei speziell hochbrechenden Glasplättchen dringt Licht nur etwa 80 nm weit in die Zelle ein. Fluoreszenz (grün) passiert den Farbteiler, während totalreflektiertes Anregungslicht (blau) aus dem Strahlengang gelenkt wird.

der die Fusion mit der Zellmembran katalysiert. Uns interessiert, wie die Exozytose in lebenden Zellen funktioniert. Mit einer Vielzahl von Verfahren lässt sich Exozytose an Einzelzellen und sogar an Einzelvesikeln mit ausgezeichneter Zeitauflösung verfolgen. Bislang allerdings messen alle Methoden nur Folgeereignisse der Exozytose, wie z. B. die Ausschüttung von Hormonen, die Freisetzung von Neurotransmittern an der Nervenendigung, oder die vom Einverleiben der Vesikelmembran herrührende Vergrößerung der Zelloberfläche. Interessante Vorläuferreaktionen konnten bisher nur indirekt durch kinetische Analyse erschlossen werden. Wir färbten daher sekretorische Vesikel in lebenden Zellen fluoreszierend an, um sie mit *Fluoreszenzmikroskopie* zu beobachten.

Da die naturgemäß kleinen sekretorischen Vesikel selbst bei intensiver Färbung nur wenig Licht abstrahlen, benötigten wir höchste Lichtempfindlichkeit. Zudem erfolgt die Exozytose sehr schnell und erfordert schnelle Abbildungsmethoden. Die in der Zellbiologie verbreitete Konfokalmikroskopie erfüllt diese Anforderungen nur begrenzt. Erstens ist ein Kon-

fokalmikroskop nicht sehr lichteffizient. Es durchflutet die gesamte Zelle mit intensivem Anregungslicht, bewirkt dadurch Strahlenschäden und verwirft dann trotzdem das meiste Fluoreszenzlicht. Zweitens ist die Schärfentiefe selten geringer als 500 nm, zu tief, um die Wechselwirkung zwischen Zellmembran und den oft erheblich kleineren Vesikeln gut aufzulösen. Drittens ist das Abrastern konfokaler Bilder mit einem Laserstrahl langsamer als das Auslesen eines reellen Bildes auf einer CCD-Kamera. Wir verwendeten daher *Totalreflexionsmikroskopie* (TR-M). Totalreflexion an der Grenzfläche zwischen einem hochbrechenden Glas und einer kaum lichtbrechenden Zelle (Abb. 1 A) erzeugt dort ein so genanntes „evaneszentes Feld“, eine dünne Schicht nichtfortgeleiteten Lichts, dessen Intensität exponentiell abfällt (Abb. 1 B) und das die Randzone einer anhaftenden Zelle selektiv beleuchtet. Ein guter optischer Aufbau strahlt nur etwa 80 nm weit in die Zelle und verwendet trotzdem jedes vom Objektiv eingefangene Fluoreszenz-Photon zur Abbildung – ideal für lichtschwache Vorgänge nahe der Zellmembran. Wenn man zusätzlich

einen Bildverstärker vorschaltet, lassen sich mit Videokameras bis zu 60 Bilder pro Sekunde aufnehmen.

Herkömmliche Varianten von TR-M wurden bereits mehrfach zur Abbildung von Einzelmolekülen an Grenzflächen benutzt, schlossen das Objekt aber in einer dünnen Schicht zwischen Objektiv und einem Prisma ein und machten es dadurch unzugänglich. Um freien Zugang zur Zelle zu bewahren, vermieden wir Prismen und erzeugten TR direkt durch das bildgebende Objektiv (**Abb. 1 C**). Das Objektiv braucht allerdings eine sehr hohe numerische Apertur, höher als der Brechungsindex der beleuchteten Zelle. Dann lassen sich Zellen mit höchstmöglicher optischer Auflösung beobachten und gleichzeitig elektro-physiologisch untersuchen. Ein neues, extrem hochaperturiges Objektiv (Fa. Olympus) ist hierzu besonders geeignet. Es gelang erstmals, zu beobachten, wie einzelne Vesikel zur Zellmembran einer Endokrinzelle wandern, dort andockten und bei Reizung Exozytose ausführen. Der Transport sekretorischer Vesikel nahe der Zellmembran ließ sich im 50-nm-Bereich verfolgen. Die Ergebnisse zeigten, dass Aktinfilamente den Transport nahe der Zellmembran vermitteln, während der Transport im Zellinnern im Wesentlichen entlang von Mikrotubuli verläuft.

Um Moleküle in Vesikeln spezifisch zu färben, wurden Vesikelproteine an grün-fluoreszierendes Protein (GFP) gekoppelt, so dass in transfizierten Endokrinzellen Einzelvesikel als fluoreszierende Punkte sichtbar wurden. Bei elektrischer Reizung lässt sich beobachten, wie GFP-gekoppeltes Protein bei Exozytose aus dem Vesikel austrat, für kleine Bruchteile einer Sekunde als „Wolke“ sichtbar blieb und dann wegdiffundierte (**Abb. 2 A**). Die Totalreflexionsmikroskopie erlaubte zudem erstmals die Beobachtung einzelner synapti-

scher Vesikel. Im Fisch-Neuron wurde ein Teil der vorhandenen synaptischen Vesikel mit dem membranständigen Fluoreszenzfarbstoff FM1-43 gefärbt. Der leuchtende Punkt in **Abbildung 2 B** zeigt ein einzelnes leuchtendes Vesikel, das nach elektrischer Reizung verschwand. Eine genauere Analyse zeigte, dass der Farbstoff durch Diffusion in die Zellmembran entwich; ein Flecken leuchtender Zellmembran war kurzzeitig sichtbar (**Abb. 2 C**). Die Abbildung gibt das Vermischen von Vesikel- und Zellmembran direkt wieder. Synaptische Vesikel sind mit einem Durchmesser von 30 nm die kleinsten Vesikel überhaupt. Mit einer Methode, die synaptische Vesikel abbildet, können alle Vesikel erfasst werden.

Unsere Erstveröffentlichung zur TR-M im Jahre 1997 hatte rasche Wirkung. Knapp drei Jahre später ist TR-M zur Untersuchung zellmembran-naher Organellen bereits bei mehreren Arbeitsgruppen im Einsatz (*Oheim, Stühmer*, MPI Göttingen, Han et al., Univ. Pittsburgh, Simon et al., Rockefeller Univ., *Toomre, Simons*, EMBL/MPI Dresden). Man darf erwarten, dass die Methode breite Anwendung findet.

Wenn eine Glas-Mikropipette auf die Zellmembran drückt, wird unter der Pipettenspitze ein mikronkleiner Fleck Membran elektrisch isoliert, der so genannte „Patch“. Durch *Kapazitätsmessungen* an Patches gelang es erstmals, sogar an sehr kleinen Vesikeln *exo- und endozytische Einzelereignisse* mit hoher Zeitauflösung zu verfolgen. An Endokrinzellen wurden Exozytose und Hormonfreisetzung aus einzelnen sekretorischen Vesikeln gleichzeitig und mit einer Zeitauflösung im Bereich von Millisekunden verfolgt (**Abb. 3**). Die Messungen zeigten einen überraschenden Befund: Gelegentlich öffneten sich sekretorische Vesikel zur Außenwelt, setzten Hormon frei und schlossen

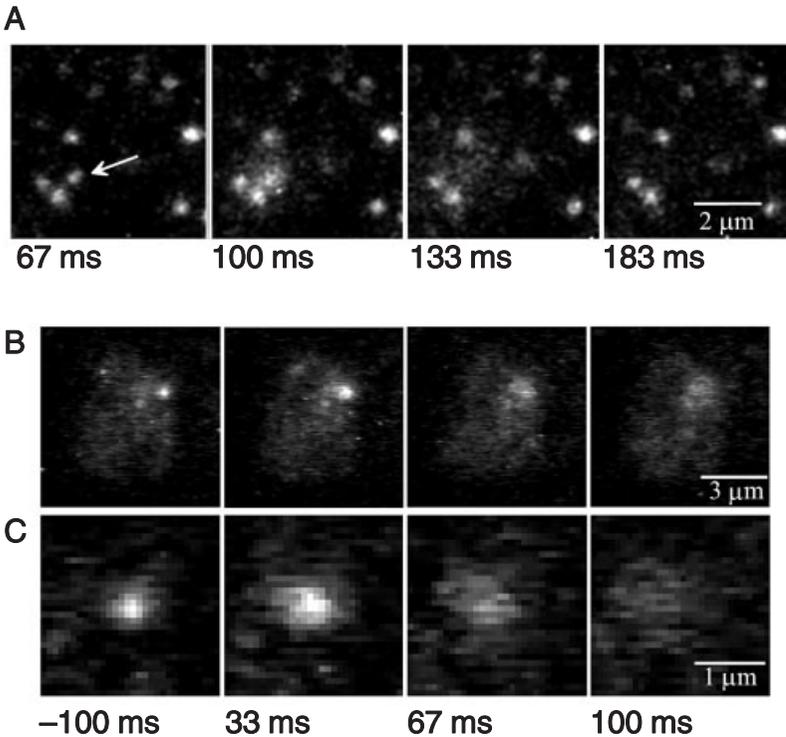


Abb. 2: A) Anhaftfläche einer Chromaffin-zelle auf einem Glasplättchen. Sekretorische Vesikel enthalten GFP-Neuropeptid Y (GFP-NPY) und sind daher fluoreszent. Die etwa zehn hellen Punkte sind einzelne Vesikel die, eng an die Membran gebunden, durch evaneszentes Licht angeregt werden. Nach Reizung durch einen Spannungspuls tritt bei einem Vesikel (Pfeil) Exozytose auf. Das enthaltene GFP-NPY entweicht, bildet kurzzeitig eine leuchtende Wolke und diffundiert aus dem Blickfeld.

B) Nervenendigung mit etwa 30 nm großen synaptischen Vesikeln, dargestellt wie in A. Die Membran einiger weniger Vesikeln (etwa 1%) ist mit einem nur in der Membran fluoreszierenden Farbstoff angefärbt (FM1-43). Ein einzelner Vesikel ist als leuchtender Punkt sichtbar, umgeben von der kaum merklich fluoreszierenden Anhaftfläche der Nervenendigung auf dem Glasplättchen. **C)** B vergrößert. Nach Reizung durch einen Spannungspuls erfolgt Exozytose. Der in der Vesikelmembran enthaltene Farbstoff breitet sich durch Diffusion in die Zellmembran aus und ist kurzzeitig als fluoreszierende „Wolke“ sichtbar. Zeitangaben relativ zum Anfang der Spannungspulse.

sich wieder, ohne sich jemals in die Zellmembran zu integrieren. Ein derartiges Verhalten wurde vor fast 30 Jahren als „Kiss-and-run“-Exozytose postuliert, aber nie zuvor beobachtet. Die Untersuchungen wurden in Spanien und den USA weiterverfolgt und führten dort zu der Erkenntnis, dass eine erhöhte Kalzium-Konzentration eine normale Exozytose in „Kiss-and-run“ verwandelt.

Die stetige Erneuerung der Zellmembran erfolgt durch so genannte „konstitutive“ Exo- und Endozytose äußerst kleiner Vesikel. Durch Kapazitätsmessungen an Patches wurden beide Vorgänge erstmals auf der Ebene einzelner exo- und endozytischer Ereignisse verfolgt. Manche Patches zeigten nur Exozytose, andere nur Endozytose. Die beiden Prozesse halten sich lokal also keineswegs die Waage und müssen daher für die gan-

ze Zelle durch Regulationsmechanismen im Gleichgewicht gehalten werden. Interessanterweise öffneten sich exozytische Vesikel oft kurzfristig, um sich dann wieder zu schließen, ähnlich wie in der Endokrinzelle in Abb. 3. Vergleichbar schnürten sich endozytische Vesikel kurzzeitig ab, öffneten sich aber alsbald wieder zum Extrazellulärraum. Bei konstitutiver Exo- und Endozytose verbinden Vesikel sich also wiederholt mit der Zellmembran und trennen sich dann wieder. Überraschenderweise wiederholen manche endozytischen Vesikel diesen Zyklus rhythmisch für mehrere Minuten. Eine Hemmung der Proteinkinasen macht dieses Verhalten zum Regelfall. Rhythmisches Öffnen und Schließen wurde in den 80er Jahren als Mechanismus zur Aufnahme der Folsäure postuliert, jedoch nie bewiesen („Potozytose“). Es verrät das

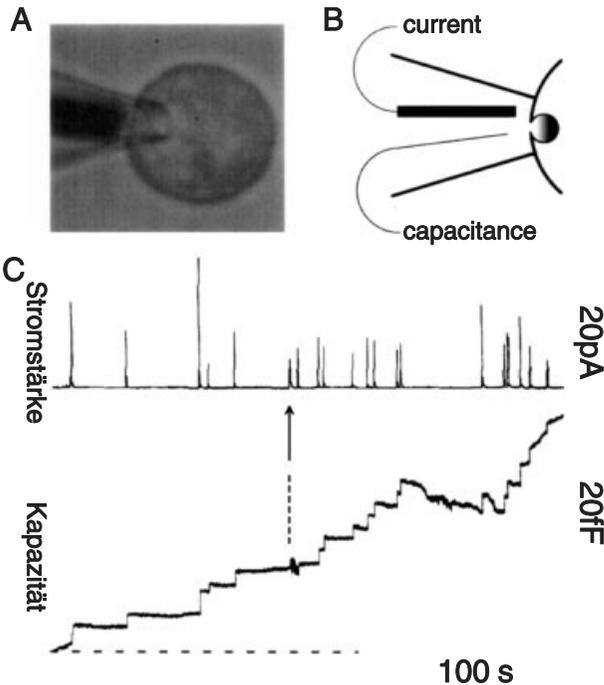


Abb. 3: A) Chromaffinzelle mit anhaftender Glas-Mikropipette. Die schwarze Kohlefaser ist in der Pipettenspitze gut sichtbar. Bildausschnitt 20 μm lang. B) Schematische Darstellung der Zelloberfläche (rechts) mit einem exozytierenden Vesikel. Durch die an der Zelloberfläche haftende konische Pipettenspitze wird der Membran-„Patch“ mit dem exozytierenden Vesikel elektrisch isoliert. Die Salzlösung in der Pipette schafft einen elektrischen Zugang zum Patch, um dort die elektrische Kapazität der eingeschlossenen Zellmembran zu messen. Gleichzeitig oxidiert die unter Spannung stehende Kohlefaser das aus dem Vesikel austretende Noradrenalin und

Wirken eines *biochemischen Oszillators*.

Einzelmoleküle bewegen sich stochastisch. Daher lässt sich ein rhythmisches Verhalten auf molekularer Ebene nur bei einer Vielzahl aufeinanderfolgender Reaktionsschritte erklären, von denen jeder eine ähnliche Geschwindigkeitskonstante hat. Dann mittelt sich die Zufälligkeit der Einzelschritte zu einer konstanten Gesamtgeschwindigkeit. Dies kann bei polymerisierungsabhängigen Reaktionen auftreten. Ein rhythmisches Öffnen und Schließen von Vesikeln wäre denkbar, wenn ein knospendes endozytisches Vesikel Myosine bindet, die es entlang einem Aktinfilament Schritt für Schritt ins Zellinnere zerren und dadurch die Verbindung zwischen Vesikelinnerem und Außenwelt verengen, bis sie abreißt. Wenn aber die erforderliche Zugkraft zu groß wird, reißt das Myosin ab, das Vesikel schnell zur Zellmembran

zurück und die Verbindung öffnet sich wieder. Dies kann sich mehrere Male wiederholen.

Alternativ kann Aktin auch ohne Myosin Bewegung erzeugen. Z. B. haben Bakterien wie *Listeria* einen Membranfleck, der Aktin-Monomere Schritt für Schritt zu Filamenten polymerisiert. Das Wachsen der Aktinfilamente schiebt das Bakterium durch die Zelle. Bei Mutanten vergrößert und verringert sich die Schubkraft rhythmisch und treibt die Bakterien in regelmäßigen Abständen ruckweise vorwärts.

Die Beteiligung von Aktin an der Endozytose wird seit Längerem auf Grund genetischer Befunde vermutet, die Art der Beteiligung ist jedoch unbekannt. Wieder wäre es denkbar, dass eine Aktin-Polymerisation das knospende endozytische Vesikel ins Zellinnere zieht, die Polymerisation aber zum Erliegen kommt, bevor sie das Vesikel vollends von der Zellmembran trennt. Auch dieser Vorgang kann sich, wie bei *Listeria*, rhythmisch wiederholen.

Eine direkte Evidenz für die Wirkung des Aktins bei der Endozytose ergab sich an mit GFP-Aktin transfizierten Mastzellen. Mastzellen in Zellkultur betreiben Makropinozytose, eine Form der Endozytose, in der Aktin-getriebene Zellfortsätze („ruffles“) sich im Außenmedium zusammenschließen und Vesikel (Makropinosomen) umhüllen. TR-M-Aufnahmen zeigten, dass Vesikel kurz vor oder nach der Trennung von der Zellmembran einen Schub Aktin-Polymerisation „zündeten“. Dieser erzeugte einen „Kometenschweif“ von Aktinfilamenten, an dessen Spitze das Vesikel sich ins Zellinnere bewegte. Die Vesikel-Bewegung erfolgte mit exakt der gleichen Geschwindigkeit wie die Bewegung von *Listeria* in infizierten Zellen. Augenscheinlich haben sich *Listeria* und ähnliche Mikroorganismen hier einen physiolo-

gisch wirkenden Vesikel-Transportmechanismus angeeignet. Die Untersuchung legt nahe, dass Aktin durch Polymerisation zunächst dem knospenden Vesikel bei der Trennung von der Zellmembran hilft, um es anschließend zu dessen Weiterverarbeitung ins Zytosol zu schieben (*Albillos, Alvarez de Toledo, Giese, Henkel, Kleppe, Lang, Lindau, Merrifield, v. Schlabrendorff, Steyer, Wacker, Zenisek*).

Abteilung Zellphysiologie

Direktor: Prof. Dr. Bert Sakmann

Arbeitsgebiete

Molekulare Grundlagen der interzellulären Signalvermittlung im zentralen und peripheren Nervensystem; molekularer Aufbau transmitter- und spannungsgesteuerter Ionenkanäle und Mechanismen der Regulation ihrer Expression.

Selbständige Nachwuchsgruppe Ionenkanalstruktur

Leiter: Dr. Dean R. Madden

Arbeitsgebiete

Struktur und Funktion von ligandenaktivierten Ionenkanälen, Vermittlern von interzellulären Signalen im Zentralen Nervensystem. Wir untersuchen die Struktur von Glutamatrezeptoren und von ihren Ligandenbindungsdomänen mit Hilfe von Elektronenmikroskopie und Röntgenkristallographie. Gleichzeitig charakterisieren wir die Bindung von Agonisten und die damit verbundenen Strukturänderungen mit spektroskopischen und biochemischen Methoden. Durch diese komplementären Ansätze möchten wir die Aktivierung und Desensibilisierung von GluR auf molekularer Ebene verstehen. Protein für diese Arbeiten wird in einem Insektenzellsystem überexprimiert und an-

schließend aufgereinigt. Die kristallographische Strukturbestimmung an einer H⁺-ATPase der P-typ Familie stellt ein zweites Projekt dar. Diese ATPasen sind für den Aufbau und für die Aufrechterhaltung von transmembranen Ionengradienten verantwortlich, die für eine Vielzahl physiologischer Prozesse essenziell sind (z. B. Signale im Nervensystem).

Selbständige Nachwuchsgruppe Entwicklungsgenetik des Nervensystems

Leiter: Dr. Harald Hutter

Arbeitsgebiete

Identifizierung und Studium von Genen im Nematoden *Caenorhabditis elegans*, die eine bedeutende Rolle bei der axonalen Wegfindung und synaptischen Zielerkennung spielen. Dies beinhaltet insbesondere die molekulare und phänotypische Analyse von Mutanten mit entsprechenden Defekten im Nervensystem, die im Labor neu isoliert wurden. In einem komplementären Ansatz werden aus dem mittlerweile vollständig sequenzierten Genom interessante neue Genfamilien auf eine mögliche Rolle bei der Entwicklung der Verschaltung des Nervensystems hin untersucht.

Arbeitsgruppe Molekülkristalle

Leiter: Prof. Dr. U. Haebleren

Arbeitsgebiete

Ordnungs-Unordnungs- und inkomensurable Phasenübergänge in Molekülkristallen und die diese Phasenübergänge begleitende Moleküldynamik. Phosphor-NMR an Einkristallen und Phosphor-„magic-angle-sample-spinning“-NMR an Pulverproben des Proteinkomplexes p21ras/GppNHp mit Folgerungen zur Struktur dieses Komplexes. Optimieren und Bau von

erzeugt somit einen Stromstoß.

C) Aufzeichnung der von der Kohlefaser abgeleiteten Stromstöße („current“) und der Patch-Kapazität („capacitance“) als Funktion der Zeit. Kapazitätsstufen zeigen sprunghafte Vergrößerungen der Patch-Oberfläche an, deren jede von der Exozytose eines etwa 300 nm großen Vesikels herrührt (unten). Jede Kapazitätsstufe ist von einem Stromstoß begleitet (als vertikale Linien in der oberen Spur sichtbar) der das aus dem Vesikel freigesetzte Noradrenalin nachweist. Ein einziger Stromstoß (Pfeil) ist nicht von einer Kapazitätsstufe begleitet; dieser Vesikel schließt sich wieder nach Freisetzung des Hormons und vergrößert daher nicht dauernd die Patch-Kapazität.

Resonatoren für die Bildgebung mit magnetischer Resonanz. Spezifisches Markieren organischer und bioorganischer Moleküle mit den Isotopen C-13, Deuterium, N-15, O-17 und O-18. Synthese von Molekülen, die neuartige kolumnare Mesophasen aufweisen und Charakterisierung dieser Mesophasen mit Methoden der NMR, DSC und optischer Mikroskopie.

Arbeitsgruppe Organische Chemie

Leiter:

Emeritus Professor Dr. Dr. H. A. Staab

Arbeitsgebiete

Untersuchungen der Strukturabhängigkeit chemischer, biochemischer und physikalischer Eigenschaften organischer Verbindungen; komplexe Synthese von Modellverbindungen für die Untersuchung spezifischer Struktur-Eigenschafts-Beziehungen; Aufklärung der elektronischen und räumlichen Strukturen durch magnetische Kernresonanz, Röntgen-Strukturanalyse, Massenspektrometrie und andere physikalische Methoden.

Spezielle Probleme, die auf diese Weise untersucht werden, sind die Abhängigkeit zwischenmolekularer Wechselwirkungen (Wasserstoffbrücken, Charge-Transfer- und Excimeren-Wechselwirkungen) von chemischer Struktur und räumlicher Anordnung sowie chemische Mechanismen biologisch wichtiger Reaktionen wie Redoxäquivalent-Übertragung. Ein Schwerpunkt der Forschungsarbeiten liegt jedoch seit mehreren Jahren in dem Gebiet der Synthese, Strukturaufklärung und der Untersuchung der Elektronen-Übertragungen in Modellsystemen zur biologischen Photosynthese. Als solche Modellsysteme wurden neue Porphyrin-

Chinon-Verbindungen synthetisiert, für die photoinduzierte Elektronen-Übertragungen in Abhängigkeit von Abstand, Orientierung und Elektronenaffinität der Chinon-Komponenten mit zeitaufgelöster Spektroskopie im Picosekundenbereich untersucht wurden. In Ergänzung zu den bisher untersuchten Porphyrin-Chinon-Cyclophanen wurden komplexere Systeme (Triaden, Tetraden) synthetisiert, die der Anordnung von Chlorophyllen und Chinonen in biologischen Systemen weiter angenähert sind, sodass mehrstufige Elektronen-Übertragungen untersucht werden können. In Weiterführung früherer Forschungsgebiete interessieren Bindungssysteme mit ungewöhnlicher elektronischer und sterischer Struktur wie z. B. neue Typen von Radikalen und Radikationen, Cycloarene (z. B. Kekulen). Mit der Synthese von so genannten „Protonenschwämmen“ wurden extrem starke organische Basen erhalten.

Ein weiteres Arbeitsgebiet betrifft die NMR-spektroskopische Strukturuntersuchung von Oligo- und Polysacchariden aus biologisch aktiven Glykoproteinen und Glykolipiden mit dem Ziel der Aufklärung der Strukturabhängigkeit der biologischen Wirkung (z. B. Immunaktivitäten); dabei werden die experimentellen Untersuchungen der dreidimensionalen Strukturen durch theoretische Simulationen („molecular modelling“) ergänzt.

Arbeitsgruppe Prof. Dr. Heinz Faulstich

Arbeitsgebiete

Struktur und Wirkung der Toxine des Grünen Knollenblätterpilzes *Amanita phalloides*. Darstellung chemisch modifizierter Amatoxine und Phallotoxine, die als Werkzeuge in der Moleku-

larbiologie oder als Tumortherapeutika Verwendung finden können. Untersuchung der strukturellen Voraussetzungen für die Wechselwirkung zwischen Peptiden und Proteinen. Untersuchung von Protein/Proteinwechselwirkungen mit Hilfe neuartiger, thiol-spezifischer Reagenzien.

Arbeitsgruppe Dr. Thierry Soldati

Arbeitsgebiete

Funktionen ungewöhnlicher Myosine als molekulare Motoren und Bedeutung für intrazelluläre Transportprozesse, molekulare Wechselwirkungen und Integration in Signaltransduktions-Kaskaden.

Molekulare Motoren und Cytoskelett-Filamente erfahren als wesentliche Komponenten eines gerichteten Transportsystems immer mehr Beachtung. Die Bedeutung der myosin-abhängigen Transportprozesse an Aktinfilamenten wurde erst in letzter Zeit voll erkannt. Obwohl die daran beteiligten Motoren, so genannte ungewöhnliche Myosine, bereits in den verschiedensten Organismen identifiziert wurden, ist über ihre genaue molekulare Funktion wenig bekannt. Wir untersuchen daher diese Prozesse in einem potenten Modellorganismus, wie dem eukaryotischen Einzeller *Dictyostelium discoideum*, der den Einsatz sowohl biochemischer als auch molekulargenetischer Methoden erlaubt. Unsere ersten Ergebnisse zeigen, dass *D. discoideum* mindestens zwei bislang unbekannte Myosine exprimiert. Die Analyse ihres Expressionsmusters und intrazelluläre Lokalisierung, zusammen mit der gezielten Ausschaltung von Genen oder der induzierbaren Expressi-

on dominant-negativer Myosine, werden ihre Funktion und Wirkorte aufklären. Dieses Vorgehen wird auf effiziente Weise Erkenntnisse über myosin-abhängige Bewegung liefern, und damit zum Verständnis einer grundlegenden Zellfunktion beitragen. Neben diesem Hauptthema untersuchen wir auch unkonventionelle Mechanismen der Retention im endoplasmatischen Retikulum und die Dynamik der Morphologie von Endocytosekompartimenten mittels einer neuentwickelten Methode für Cryofixation und Immunfärbung.

Em. Wissenschaftliche Mitglieder

Prof. Dr. Wilhelm Hasselbach

Arbeitsgebiete

Zellkalzium: Transport und Freisetzung.

Prof. Dr. Karl H. Hausser

Arbeitsgebiete

Molekülphysik, insbesondere Untersuchungen von organischen Molekülkristallen und Biomolekülen mittels Elektronen- und Kernspinresonanz und Relaxation.

Prof. Dr. Dr. Hartmut Hoffmann-Berling

Arbeitsgebiete

DNA-Helikasen; aktive Verlagerung von Protein entlang DNA.