

Journal-Club

mit Lothar Jaenicke

Probiotische

► Probiotische hat einen etwas mehrdeutigen Beiklang, teils Ortho-, teils Para-, teils Pseudowissenschaft. Hier gemeint ist, dass manche bakteriellen Invasionen hilfreich und gesund sind, um die vegetative Darmflora zu erhalten. Das gilt vor allem für Lactobazillen und Bifidobakterien, Milchsäurebakterien, die auch für Yoghurt Reklame machen und deren Stoffwechselfaktoren schon Richard Kuhn beschäftigt hat, nicht nur Naturheilkundige und Alternativmediziner. Es steht fest, dass diese Bakterien eine günstige Wirkung auf Verdauungsstrakt und Verdauung haben, aber man weiß kaum etwas über den biochemischen Mechanismus.

F. YAN und D. B. POLK (*J. Biol. Chem.* 277 (2002) 50959 – 50965) gehen bei dem Yoghurtbakterium *Lactobacillus rhamnosus* GG als Modellorganismus den verschiedenen vorgeschlagenen Möglichkeiten nach, wodurch dieser Darmschleimhautentzündungen bei Colon-Zellkulturen von Maus und Mann verhindert: Cytokin-Stimulierung?; IgA-Sekretion?; Antibakterielle Wirkung?; Stärkung der Intestinalbarriere?; Siegreiche Konkurrenz um Enterocyten-Bindung?

Sie zeigen, dass gemeinsame Kultur von *L. rhamnosus* GG mit Colon-Zellen die antiapoptotische Akt/Proteinkinase B aktiviert, die proapoptotische MAPkinase durch Tumornekrosefaktoren, Interleukin oder Interferon hemmt und damit das Überleben der Zellen von der plus- und minus-Seite her fördert. Auf diese Weise scheint tatsächlich die probiotische Mikroflora der Umwelt Darmzellen zu schützen und den Milchmarktprodukten mehr als nur eine Milchmädchenrechnung zugrunde zu liegen.

Kein Sehen ohne Sauerstoff

► Neuroglobin ist ein intrazelluläres Häm(Fe^{2+})-Atmungsprotein, vor allem im Nervengewebe, aber auch im Endokriniem. Es hat weniger als 25% Sequenzhomologie zu Wirbeltier-Hämoglobin oder -Myoglobin, mit dessen O_2 -Sättigungskurve es jedoch, bei komplexerer Kinetik, übereinstimmt (P_{50} ca. 2 Torr), ähnelt aber den neurospezifischen Globinen der Invertebraten. Neuroglobin regelt die O_2 -Homöostase des Nervengewebes, darunter auch der (neurogenen) Retina, wie M. SCHMIDT, A. GIESSL *et al.* und T. BURMEISTER (*J. Biol. Chem.* 278 (2003) 1932 – 1935) mitteilen. Die Retina hat einen enormen Stoffwechsel-Energiebedarf, der aus der Glukose-Oxidation gedeckt wird. Er ist relativ größer als der des übrigen Nervengewebes; sein Block schädigt das

Sehvermögen bis zur Blindheit. Sauerstoff gelangt zur Retina nicht direkt über das Blut-Hämoglobin, sondern durch Diffusion durch das Pigmentepithel und vermittelt durch den Zwischenträger Neuroglobin. Dieses hat in der Retina die gleiche Konzentration (um 100 μM) wie Myoglobin in Skelett- und Herzmuskel; es wird in allen Neuronen der Retina (der Maus), den plexiformen Schichten und den ellipsoiden Bereichen der Photorezeptor-Innensegmente, also überall, wo Mitochondrien sind und O_2 -Bedarf herrscht, exprimiert, nicht aber im nicht atmenden Pigmentepithel; seine intraretinale Verteilung geht also dem Sauerstoffverbrauch parallel. Neuroglobin ist demnach das respiratorische Hämoprotein der Säuger-Retina.

Protein-Transduktion gibt es nicht

► Für verschiedene Proteine von besonderem medizinischen Interesse wurde auf Grund von Fluoreszenz-Mikroskopie oder -Zellsortierung berichtet, sie durchträten ohne Hilfe die Plasmamembran. Man hat sogleich Theorien und Anwendungen extrapoliert, etwa, derartige, meist sehr hydrophile „Cell penetrating“ Peptide (CPP) wie HIV-Tat 48/60 oder Nonaarginin, covalent oder anders mit Therapeutica zu koppeln, um sie als Methode der Wahl in den Körper unter Umgehung natürlicherer Wege einzubringen. Der Mechanismus dieses Vorgangs blieb aber unklar. Er ist nicht Temperatur- oder Energie- oder Struktur-abhängig, und es wurde postuliert, dass er weder auf Endocytose noch auf Transportern beruht, sondern eine direkte „Transduktion“ durch die Membran darstellt. Das würde allerdings ein radikales Umdenken über die Struktur der Li-

piddoppelschicht bedeuten. Wir brauchen es nicht! J. P. RICHARD *et al.* und K. MELIKOV (*J. Biol. Chem.* 278 (2003) 585 – 590) zeigen, dass es ein Artefakt der Probenzubereitung ist. Diese werden zwar unter milden Bedingungen mit Methanol fixiert, aber bereits dadurch assoziieren CPPs und Kernhiston H1 im Kern und erzeugen Falschbilder im Vergleich zu unfixierten Proben. Klassische Endocytose-Marker zeigen dies Verhalten nicht, sondern nur die stark kationischen „CPPs“, die an die vorwiegend negativ geladenen Membran-Phosphatide binden und dadurch den Doppelschicht-Zusammenhang lösen. Vermeidet man diese Artefakte, verhalten sich die „CPPs“ ganz normal und gelangen in die Zelle durch ganz gewöhnliche Endocytose. Dort werden sie dann in den Kern aufgenommen. Basta.

Lysosomen-Import

► Die klassischen Untersuchungen über die Rezeptor-vermittelte Endocytose setzten das Paradigma einer spezifischen Sortiermaschinerie zu den Lysosomen, die durch Ubiquitinylierung von speziellen C-End-nahen Lysin-Resten in der Cytoplasma-Domäne des Transportguts bei Hefe und Säugern in Gang gesetzt wird. Viele G-Protein-gekoppelte (GPCR) Signalrezeptoren werden nach Dienst ausgemustert und zur Cytoplasmamembran rezykliert – so die Lehrbuch-generalisierte Vorstellung. Ist sie wirklich berechtigt? Am Delta-Opioid-Rezeptor (DOR) embryonaler Nieren (HEK293)-Zellen des Menschen in Kultur, der, durch endogenen Neuropeptide geschaltet, eine Ereigniskette in Gang setzt, untersuchten M. TANO-WITZ und M. VON ZASTROW (*J. Biol. Chem.* 277 (2002) 50219 – 50222) die mögliche Funktion von Proteasomen-Aktivität und covalenter Ubiquitinylierung. Sie zeigen, dass die Verallgemeinerung voreilig ist: Zusatz des hochspezifischen Proteasomen-Inhibitors Lactacyclin vermindert die DOR-Proteolyse nicht signifikant, obwohl die Liganden-induzierte Proteolyse von EGF-Rezeptoren unvermindert bleibt. Wegmutation aller relevanter Lysin-Reste im DOR gab zwar einen Rezeptor, der nicht mehr ubiquitinyliert, wohl aber noch unverändert endocytosiert, in den Lysosomen lokalisiert und dort hydrolysiert wird. Die Ergebnisse zeigen also, dass – mindestens für den gegebenen Fall – die Bindung von Ubiquitin weder für die ligandeninduzierte Endocytose noch für den danach stattfindenden Transport nötig ist: Es gibt auch einen Ubiquitinylierungs-unabhängigen Lysosomen-Verkehr von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren.

Des einen Tod, des anderen Brot

► Bei Gerüchen sich zersetzender organischer Substanz denkt man meist zunächst an Stickstoffverbindungen, Amine oder Indole. Diese sind aber eigentlich nicht abstoßend unangenehm; in sehr hoher Verdünnung duftet Indol sogar nach Jasmin. Ärger ist es mit den Abbauprodukten der Schwefel-Aminosäuren Cystein und Methionin. Diese sind die eigentlichen Träger des Aas-Geruchs und des Geruchs der Atemluft schwer Leberkranker – aber ein Genuss und Signalstoff für die Aasfliege *Calliphora*, die ihr Geschmeiß auf das gefundene Fressen legt. Das nutzt der Aronstab, um mit seinem Kadaver-Duft Fliegen anzulocken, sie in die – übrigens durch entkoppelten Stoffwechsel gut gewärmte – Befruchtungsampulle zu sperren, in der sie enttäuscht umherkrabbeln, bis sie Pollen auf die Narbe gebracht haben. Dann öffnet sich das Gefängnis, und auch die Bildung

der lockenden Geruchstoffe stoppt. Diese wurden von M.C. STENNMYR *et al.* (*Nature* 420 (2002) 625) gaschromatographisch getrennt und durch Elektroantennographie bei *Calliphora* analysiert. Die Chemorezeptor-aktiven Substanzen sind Dimethylsulfid ($(\text{CH}_3)_2\text{S}$), Dimethyl-disulfid ($(\text{CH}_3)_2\text{S}_2$) und Dimethyl-trisulfid ($(\text{CH}_3)_2\text{S}_3$) in seinen beiden Stereoisomeren (Ring und Kette). Es sind genau dieselben Substanzen, die in verwesendem Fleisch den penetranten Geruch und die chemotaktische Antennenwirkung hervorbringen, die die Fliegen zur Eiablage locken. Dies tun sie übrigens in der Aronstab-Falle nicht – es gehören also mehrere Reize zum kompletten physiologischen Fortpflanzungsgeschäft. Ähnlichen Betrug an Kadaver-suchenden Insekten übt auch die Orchidee *Ophrys* (Hummelragwurz) aus, die obendrein noch mit optischer Camouflage arbeitet.

Eine noch primitivere binäre Primitiv-Welt der Ribozyme

► Die RNA-Welt, die man für die erste auf Erden hält, hat einen Schönheitsfehler: Von den vier Basen der als Ribozyme codierenden und katalysierenden RNA ist Cytosin instabil: Es desaminiert leicht zu Uracil – bleiben drei Ribonucleotide, mit denen sich nicht WC (oder eigentlich EC)-paaren und keine Welt aufbauen lässt. Kann nun ein Ribozym aus nur zwei Basen paaren, informieren und katalysieren? J. S. READER und G. F. JOYCE (*Nature* 420 (2002) 841 – 844) haben sich die Frage gestellt und können sie durch das Experiment bejahen. Die untersuchte Ribozym-katalysierte Reaktion ist die RNA-Ligierung, die der Reaktion des Proteins RNA-Polymerase entspricht: Eine RNA-Nucleotid mit freier 3'-OH-Gruppe greift am terminalen 5'-Triphosphat eines RNA-Substrats an, und es

entsteht unter Austritt von PP_a ein 3',5'-Phosphodiester. Ein R3-Ribozym aus nur den Basen A, G und U hat nach vorangegangenen Untersuchungen für diese Reaktion bereits die katalytischen Daten: $k_{\text{cat}} = 0,013 \text{ min}^{-1}$; $K_m = 6.2 \text{ }\mu\text{M}$. Sie wurde als Ausgangspunkt genommen und nach ihr ein binäres RNA-artiges Informations-Makromolekül mit den zwei Basen 2,6-Diaminopurin und Uracil, iterativ und kombinatorisch entwickelt. Das Endprodukt erfüllt tatsächlich die Erwartung: Das Ribozym aus nur zwei (über drei Wasserstoffbindungen) paarenden Basen katalysiert spezifisch die Matern-gerichtete Bindung von zwei RNA-Molekülen nach dem angegebenen Prinzip mit einer Geschwindigkeit, die 36.000mal größer ist als die der unkatalysierten Reaktion.

Nidation durch L-Selectin

► Zelladhäsion unter Flux geschieht durch spezielle Lektinartige Bindeproteine, die Selectine, die bestimmte Oligosaccharid-Kombinationen erkennen. Man kennt das vor allem bei der Vasculatur der Leukozyten, die am Epithel der Blutgefäße entlang rollen, durch Selectine eingefangen und dann durch sofort aktiviertes Integrin festgehalten werden, damit sie durch die Epithelwand hindurchwandern. Auf morphologischem Niveau ist die Nidation des befruchteten Eies im Uterusepithel dieser Transvasation sehr ähnlich. Hier aber ist der Flux durch die Mucin-Sekretion bewirkt, und die Blastocyste bindet darin nicht sehr fest, sodass immer ein erheblicher Teil der Anlagen bevölkerungsregulierend verloren geht. Auf molekularer Ebene allerdings unterscheidet sich die Trophoblasten-Placentation nach der Integrin-vermittelten Implantation durchaus. Doch O. D. GENBACHEV *et al.* S.J. FISHER (*Science* 299 (2003) 405–408) stellten die experimentelle Frage, ob Selectin-Liganden bei der Blastocysten-Adhäsion zur gegebenen Zeit und am gegebenen Ort der utero-fetalen Grenzschicht gebildet werden, indem sie deren Expression mit den einschlägigen molekularen Immunfluoreszenz- und Blot-Verfahren verfolgten. Sie benutzten dazu an Perlen fixierte Antikörper, die sulfatierte Oligosaccharide binden, die ihrerseits mit L-Selectin

des Trophoblasten interagieren. Dieser exprimiert L-Selectin auf der fetalen Seite. In der nicht-rezeptiven Follikularphase des Zyklus ist die Wechselreaktion mit dem luminalen Epithel des Uterus sehr gering, aber in der rezeptiven Lutealphase außerordentlich einflussvoll. Das L-Selectin/

Liganden-System ist also auch außerhalb der Blutgefäßendothelien in der Gebärmutter funktionell und bewirkt hier durch Wechselwirkung des Trophoblasten mit dem Uterusepithel, dass der für eine Schwangerschaft kritische Adhäsionsvorgang zustande kommt.

Metall-Cofaktoren als Helfer oder Hemmer von Phosphodiesterasen

► Viele Nucleotide umsetzende enzymatische Reaktionen brauchen zweiwertige Metalle als fördernde oder hemmende essentielle Cofaktoren; ihre eigentliche Funktion ist aber nur beschrieben, nicht verstanden, denn sie korreliert nicht mit den gängigen anorganischen Parametern. Es ist klar, dass die Spaltung einer Phosphodiester-Bindung über eine konzertierte nukleophile Substitution läuft, aber eine Frage, ob das angreifende Nukleophil ein H₂O-Molekül oder OH⁻-Ion ist und wie das Metall-Ion hierbei fungiert. Am Beispiel der DNA-Doppelstrang-spaltenden Restriktionsendonuclease BamHI, die durch Mg²⁺ antagonistisch zu Ca²⁺ aktiviert wird, einem häufigen, aber ungeklärten Charakteristikum solcher Phosphatasen, unternehmen T. MORDASINI, A. CORIONI und W. ANDREOTTI (*J. Biol. Chem.* 278 (2003) 4381–4384) eine Com-

putersimulation auf Grund quantenmechanischer Behandlung der Umgebung des Aktionszentrums und molekularmechanistischer Modellierung der Außenbezirke, wodurch die elektrostatischen Wechselwirkungen fokussiert werden. Der Vorteil des Systems ist der geringe Unterschied zwischen den C_α-Stellungen vor und nach der Reaktion. Im Aktiven Zentrum stehen zwei Me²⁺. Zur Errechnung der Energieprofile wurde die Phosphodiestererspaltung durch OH⁻, intrinsisch oder extrinsisch, für die Deprotonierung des H₂O-Moleküls der Abstand vom protonierenden Glu-113 herangezogen. Die Ergebnisse zeigen unzweideutig, dass die Kinetik der Reaktion für das so unterschiedliche Verhalten von Mg²⁺ und Ca²⁺ verantwortlich ist. Über die Substratkomplexierung hinaus arbeiten die beiden eingebundenen Me²⁺ zusammen und führen zu einem Übergangszustand, der ihre Koordinationsschalen in einer Weise stört, die mit der Koordination von Mg²⁺ (und anderer als Coaktivatoren bekannter Me²⁺, wie Mn²⁺, Co²⁺, Zn²⁺ und Cd²⁺), nicht aber von Ca²⁺ kompatibel ist. Entscheidend ist also die Kinetik während der Reaktion, nicht irgendwelche Eigenschaft des Enzyms vor dieser – wohl eine allgemeine Folgerung für derartige Abläufe.

Steroidhormone

kontrollieren Lebensspanne (bei der Fliege)

► Beim Menschen ändert sich der Hormonhaushalt beim Altern – aber ist es Ursache, ist es Wirkung? Eine solche Frage lässt sich leichter bei *Drosophila* beantworten, und das haben A. F. SIMON, C. SHIH, A. MACK und S. BENZER (*Science* 299 (2003) 1407–1410) getan, indem sie die Wirkungen des Verpuppungshormons Ecdyson im Lebensverlauf geschlüpfter Fliegen vom Tag der Begattung an vergleichend mit Mutanten im heterodimeren Rezeptor für Ecdyson (EcR) und das Retinoid-Homologe „Ultraspirakel“ (RXR/USP), also EcR-USP, untersuchten. Dieser bildet im Ruhezustand einen Komplex mit Corepressorproteinen, die an chromosomale Histon-Deacetylasen binden. Der physiologische Gang der Dinge ist, dass dieser Komplex in Anwesenheit von Ecdyson stattdessen an Coaktivatoren bindet, die Histonacetyltransferasen aktivieren und dadurch die Transkription verschiedener Gene in Gang setzen. Heterozygote Fliegen im EcR leben fast doppelt so lange und sind gegen verschiedene Stressoren (O₂, Temperatur, Trockenheit, Hunger) resistenter ohne in der Fruchtbarkeit oder Lebenstätigkeit geschädigt zu sein. Die gleiche Wirkung hat eine Mutation in der Biosynthese von Ecdyson; sie wird durch Ecdysonfütterung aufgehoben. Die Lebensspanne hängt hier also von zwei verschiedenen Komponenten ab, dem Liganden und dessen Rezeptor, und kann durch Manipulieren eines jeden beeinflusst werden, vermutlich durch Verschiebung des Gleichgewichts zwischen Repression und Aktivierung verschiedener Ziel-Gene. Ähnlich scheinen bei Insekten auch Juvenilhormon, bei Wirbeltieren Insulin zu wirken.