

- ▶ Energie-getriebener Transport durch die äußere Membran von *Escherichia coli*
- ▶ Neue Anti-Gram-negative Leitstruktur mit dualem Wirkmechanismus
- ▶ Sulfatierte Zeckenspucke hilft bei Entzündungen



Volkmar Braun

Heike Brötz-Oesterhelt

Jonathan Wolf Mueller

Khadija Aichane

DOI: 10.1007/s12268-020-1461-8  
© Springer-Verlag GmbH 2020

## Energie-getriebener Transport durch die äußere Membran von *Escherichia coli*

**Substrate werden durch die äußere Membran (OM) Gram-negativer Bakterien über Diffusion, erleichterte Diffusion oder aktiven Transport aufgenommen. Da die OM kein Membranpotenzial und keine energie-reichen Substrate enthält, bedarf es für den aktiven Transport eines besonderen Mechanismus der Energiebereitstellung. Tomasz Pienko und Joanna Trylska (PLoS Comput Biol, <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1008024>) untersuchten einen aktiven Transporter mit biophysikalischen Verfahren (conventional molecular dynamics simulation, steered molecular dynamics (SMD), umbrella sampling, Gaussian force-simulated annealing).**

■ Vitamin B<sub>12</sub> (B<sub>12</sub>) bindet an das BtuB-Rezeptorprotein, das eine Fass-artige Struktur ( $\beta$ -barrel) einnimmt, die innen einen Kanal bildet, der durch eine globuläre Domäne verschlossen ist. Um die Translokation von B<sub>12</sub> durch BtuB zu bestimmen, bauten sie BtuB in eine asymmetrische heterogene Lipiddoppelschichtmembran ein, die die OM simulieren soll. B<sub>12</sub> bindet zunächst an die zehn extrazellulären Schleifen. In den SMD-Experimenten

folgt B<sub>12</sub> nicht der globulären Domäne in Richtung Periplasma, sondern wird von den extrazellulären Schleifen festgehalten. Erst beim Anlegen einer Kraft von 20 kcal/mol/Å wird B<sub>12</sub> freigesetzt, wobei die globuläre Domäne sich um 175 Å dehnt. Während der ersten 0–24 Å Domänenbewegung rotiert B<sub>12</sub> um die BtuB-Hauptachse, sodass der Corrinring parallel zur Achse orientiert ist. Die Messung der Schleifenbewegungen unterscheidet fünf Strukturvarianten: ohne gebundenes B<sub>12</sub>/ Domäne gefaltet, gebundenes B<sub>12</sub>/ Domäne gefaltet, gebundenes B<sub>12</sub>/ Domäne entfaltet, partiell transportiertes B<sub>12</sub>/ Domäne entfaltet, völlig transportiertes B<sub>12</sub>/ Domäne entfaltet. BtuB ohne Beladung mit B<sub>12</sub> steht im Gleichgewicht zwischen offener und geschlossener Form. Zu Beginn des Transports sind die Konformationen der Schleifen auf die Bindung von B<sub>12</sub> optimiert. Während der Bewegung der Domäne wird die offene Schleifenform bevorzugt, die sich über der B<sub>12</sub>-Bindestelle schließt. Die partielle Entfaltung der Domäne dient dazu, während des Transports die Schließung der Schleifen zu initiieren. Dies zeigt eine hohe Struktur-dynamik des BtuB-Transporters

mit massiven Änderungen während des Transports.

→ Die Arbeit untersucht die Strukturänderungen, die sich in BtuB bei der Bindung von B<sub>12</sub> und während des Transports von B<sub>12</sub> durch BtuB abspielen. Es werden nicht die Strukturänderungen in BtuB als Reaktion auf das elektrochemische Potenzial der Cytoplasmamembran bestimmt, das in vivo die BtuB-Pore öffnet. BtuB ist über den N-Terminus im Periplasma an TonB gekoppelt. TonB bildet zusammen mit den Proteinen ExbB und ExbD einen Komplex in der CM, der auf noch unbekannte Weise das elektrochemische Potenzial der CM für Energie-abhängige Transportvorgänge in der OM bereitstellt. Nach der gängigen Vorstellung übt TonB eine Kraft aus, die die Struktur der Domäne so verändert, dass B<sub>12</sub> durch BtuB in das Periplasma gelangt. Es gibt Antibiotika, die durch aktiven TonB-abhängigen Transport in Zielzellen eindringen. Dabei bildet die OM keine Permeationsbarriere, sondern fördert die Aufnahme.

Volkmar Braun ■

## Neue Anti-Gram-negative Leitstruktur mit dualem Wirkmechanismus

**Neue antibakterielle Substanzen mit Wirkung gegen Gram-negative Keime und neuem Wirkmechanismus, die sich als Startpunkte für die Antibiotikaentwicklung eignen, sind rar. In einem Screening auf Aktivität gegen Gram-negative Keime fiel Zemer Gitai und Kollegen (Martin JK et al., Cell (2020) 181:1518–1532) die Substanz SCH-79797 auf, ein synthetisches niedermolekulares Molekül, das zuvor als Anti-Koagulans und Herztherapeutikum beschrieben worden war.**

Positiv stachen dessen antibakterielle Breit-spektrum-Aktivität, fehlende Kreuzresistenz

gegen vermarktete Antibiotika und extrem langsame Resistenzentwicklung hervor. Breit angelegte Studien zum Wirkmechanismus zeigten, dass die Substanz zwei Targets besitzt: Eine der beiden Zielstrukturen ist die Dihydrofolatreduktase, die auch vom vermarkteten Antibiotikum Trimethoprim inhibiert wird, und das zweite Target ist die bakterielle Cytoplasmamembran. Parallel blockiert SCH-79797 den Folsäurestoffwechsel und destabilisiert die Membran. Ihre besonderen Eigenschaften verdankt die Substanz der Kombination dieser beiden Aktivitäten. Struk-

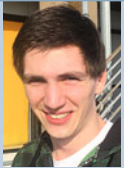
turelle Optimierung führte zur einer deutlich potenteren, von den Autoren Irresistin-16 genannten Leitstruktur mit guter Pharmakokinetik und nachgewiesener in vivo-Wirksamkeit gegen *Neisseria gonorrhoeae*.

→ Was die Arbeit interessant macht, sind elegante Wirkmechanismusstudien und die konsequente Profilierung als Leitstruktur durch Untersuchung der Pharmakokinetik, in vivo-Pharmakologie und den die Aktivität bestimmenden Gruppen des Kombinationsmoleküls.

Heike Brötz-Oesterhelt ■



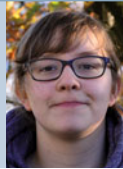
Jürgen Lassak



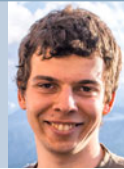
Nils Mais



Gert Bange



Daniela Kruck

Johannes  
Sander

Dmitry Shvarev

Kerstin  
SchipperMatthew  
McIntosh

Jonas Kretz

## Sulfatierte Zeckenspucke hilft bei Entzündungen

**Diese fieseln, kleinen Blutsauger lassen sich auf unserer Haut nieder – Mücken nur für kurze Zeit, Zecken gerne aber auch mal für ein paar Stunden oder gar Tage. Blutsaugende Arthropoden injizieren gleich zu Beginn ihrer Mahlzeit einen Substanzcocktail an der Einstichstelle. Eine Klasse dieser im Speichel enthaltenen Substanzen sind die entzündungshemmenden Evasine. Wie Evasine auf molekularer Ebene wirken, war bisher unklar.**

■ Mittels eines semisynthetischen Ansatzes bringt jetzt ein australisches Forscherteam Licht ins Dunkel (Franck C et al., Proc Natl Acad Sci USA (2020) 117:12657–12664). Zunächst untersuchten Charlotte Franck und ihre Mitstreiter das Evasin-Protein ACA-01 der in Amerika beheimateten Zecke *Amblyomma cajennense*. Expression in Säugetier-Zellen und anschließende Analyse mittels SDS-PAGE und Westernblot mit einem anti-Sulfotyrosin-Antikörper zeigten, dass ACA-01 sowohl glycosyliert als auch sulfatiert ist. Der N-Terminus von ACA-01 enthält zwei Tyrosin-Seitenketten, die von allerlei negativ geladenen Resten umgeben sind, ein klassisches Sulfatierungsmotiv. Massenspektrometrisch wurden doppelt-sulfatierte, einfach-sulfatierte und unsulfatierte Spezies detektiert.

Anschließend produzierten die Forscher verschiedene Varianten des Evasin-Proteins: Der N-Terminus wurde in verschiedenen Sulfatierungsvarianten mittels Festphasen-Synthese erzeugt und der Rest des Proteins wurde rekombinant hergestellt. Dann wurden die beiden Teile mittels nativer chemischer Ligation miteinander verbunden – daher auch das Wort „semisynthetisch“ im Titel der Studie. Anfangs befanden sich die Proteine noch gelöst in 6 M Guanidinhydrochlorid – entfaltet und reduziert. Darum schloss sich ein Schritt zur oxidativen Proteinfaltung an. In einem eher dünnen und leicht basischen Puffer mit Glutathion konnten sich über Nacht die vier Disulfid-Brücken ausbilden. Das Muster der Disulfid-Brücken wurde durch Massenspektroskopie der oxidierten Proteine überprüft; es entsprach dem nativen Protein.

Die verschiedenen Sulfatierungsvarianten des ACA-01-Proteins wurden schließlich auf ihre Affinität zu den Chemokinen CCL11, CCL24, CCL26, CCL2, CCL8 und CCL7 untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die Proteinsulfatierung nicht einfach nur die Affinität steigerte. Viel mehr modifizierten die Tyrosyl-Sulfate die Selektivität der ACA-01-Bindung an die verschiedenen Chemokine. Ein einzelnes Evasin-Protein zeigt also, abhängig von seinem Sulfatierungsmuster, bereits eine erstaunliche Vielfalt an Bindeeigenschaften. Im Speichel blutsaugender Arthropoden sind verschiedene Evasine mit unterschiedlichen Sulfoprotein-Varianten enthalten. Die aktuelle Studie liefert einen ersten Einblick in das komplexe molekulare Geschehen beim Einstich des Zeckenrüssels.

→ *Wir kennen Proteinsulfatierung bisher als eine Art molekularen Klebstoff. Die aktuelle Arbeit, in der sulfatierte Evasin-Proteine mit großem Aufwand erzeugt wurden, bestätigt und ergänzt dieses Bild. Zecken spielen hier molekulares Mimikry – ihre Evasine ahmen die Interaktionen zwischen Chemokin-Liganden und Chemokin-Rezeptoren nach, die im menschlichen Körper beim Entzündungsgeschehen eine Rolle spielen. Eines Tages könnten mit sulfatierten Peptiden oder Proteinen verschiedenste Krankheiten behandelt werden, bei denen Entzündungen eine Rolle spielen.*

Jonathan Wolf Mueller ■



Abb.: Eine blutdürstige Zecke. Bild: © astendal / stock.adobe.com.

## Kurz gefasst

### Abbau von Braunalgen

■ Riesentang-Wälder und blühende Golftange bedecken den Atlantik und spielen eine wichtige Rolle im globalen Kohlenstoffkreislauf. Sie produzieren Fucoidan, ein komplexes und sehr stabiles Zellwand-Polysaccharid. Andreas Sichert *et al.* (Nat Microbiol (2020) 5:1026–1039) entdeckten, dass der Fucoidan-Abbau auf ein spezialisiertes Bakterium der Gattung *Lentimonas* limitiert ist. Für den Abbau muss eine bemerkenswerte Bandbreite an 284 Proteinen exprimiert werden, die eine Fucoindanase-Aktivität besitzen und in spezialisierten bakteriellen Mikrokompartimenten agieren. Die Erkenntnisse erklären die Stabilität von Wäldern und Blüten aus Braunalgen.

Matthew McIntosh, Jonas Kretz

### Phantomgedächtnis bei der Zellteilung

■ *Staphylococcus aureus* weist nach bisheriger Sichtweise eine Besonderheit bei der Zellteilung auf: Teilungsebenen stehen jeweils senkrecht auf den beiden vorhergehenden Teilungsebenen (wie zwei Wände, die im rechten Winkel zueinander und gleichzeitig senkrecht auf dem Fußboden stehen). Bei jeder dritten Zellteilung sollte also die ursprüngliche Teilungsebene wiederverwendet werden. Damit stellte sich die Frage, wie sich die Zelle ihre bisherigen Teilungsebenen merkt. Der Mechanismus für dieses „Gedächtnis“ blieb unbekannt. Bruno Saraiva *et al.* (Nat Comm (2020) 11:4097) zeigen, dass jede Teilungsebene lotrecht auf der vorhergehenden Ebene steht; dies gilt aber nicht immer für die Ebene der vorhergehenden Teilung. Entscheidend für die neue Teilungsebene ist das Noc-Protein, das in der Nähe des *ori* bindet und die Polymerisation des Teilungsproteins FtsZ verhindert. Dies stellt sicher, dass das Chromosom bei der Teilung nicht zerschnitten wird. Ein Weitergehendes „Gedächtnis“ ist somit nicht erforderlich.

Johannes Sander

- Die Rolle von CD9 bei HPV16-Infektionen
- Selektive Translation *reloaded*: alternative Ribosomen in Mykobakterien
- Kleine Schere mit großer Wirkung
- *Heart-on-a-chip* als neuer Ansatz für die Ischämieforschung

## Die Rolle von CD9 bei HPV16-Infektionen

**Das Humane Papillomavirus Typ 16 (HPV16) kann Gebärmutterhalskrebs, eine der häufigsten Krebsarten bei Frauen, verursachen. Bei dessen Endocytose sind Tetraspanin-reiche Mikrodomänen besonders wichtig. S. Mikuličić *et al.* (Med Microbiol Immunol (2020) 209 461–471) fanden heraus, dass eine geringe CD9-Expression eine HPV16-Infektion begünstigt.**

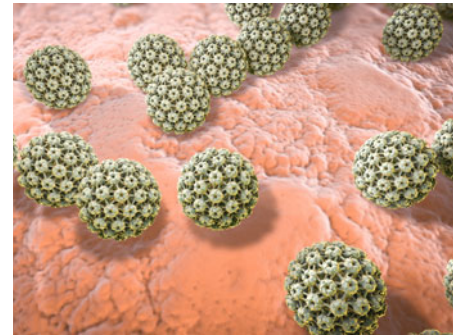
■ Das Binden des HPV16-Pseudovirus an die Oberfläche von HeLa-Zellen ist CD9-unabhängig. Allerdings verschlechtern sich der Transport von HPV16 zu CD63-positiven endosomalen Vesikeln sowie der Capsid-Abbau bei Abwesenheit des Tetraspanins CD9. Daher untersuchten S. Mikuličić *et al.* den Einfluss unterschiedlicher CD9-Expressionen auf die Infektionsrate von HPV16 in unterschiedlichen Epithelzellen. HaCaT-Zellen, eine immortalisierte Keratinozyten-Zelllinie, exprimieren 4- bis 10-mal mehr endogenes CD9 als HeLa-Zellen und normale humane epidermale Keratinozyten (NHEK). Während ein siRNA-Knock-

down von CD9 zu einer Abnahme der HPV16-Infektionsrate in HeLa- und NHEK-Zellen führt, kommt es in HaCaT-Zellen zu einer Zunahme. Es wird geschlossen, dass sowohl eine Abwesenheit als auch eine Überexpression von CD9 zu einer verminderten HPV16-Infektionsraten führen. Dies wird nochmals dadurch bestätigt, dass bei einer Transfektion mit zunehmenden Mengen an CD9 in HeLa-Zellen die Infektionsrate dosisabhängig abnimmt. Daher fördert lediglich eine geringe CD9-Konzentration, wie sie natürlich in HeLa- und NHEK-Zellen vorkommt, eine HPV-Infektion. Weiterhin steuert dieses Tetraspanin auch die Sheddase-Aktivität der Zellmembranprotease ADAM17, welche den ERK-Signalweg aktiviert. Letzterer spielt wiederum eine Rolle in der Bildung des HPV16-Eintrittsrezeptors. Sowohl eine CD9-Überexpression als auch eine Depletion verringern die ERK1/2-Phosphorylierung in HeLa-Zellen.

→ *CD9 ist ein wichtiger Regulator für den Viruseintritt von HPV16 und wirkt sich auch*

*auf den ERK-Signalweg aus. Diese Studie hebt die Bedeutung von Tetraspaninen als master organizers hervor, wodurch diese mögliche antivirale targets darstellen – auch in Bezug auf andere Viren (Influenza A und Coronavirus). Dabei könnte speziell CD9 interessant sein, da es offenbar als Regulator für HPV16-basierte Infektionen genutzt werden könnte.*

**Khadija Aichane** ■



**Abb.:** 3D-illustration des Humanen Papillomavirus. Bild: © Kateryna\_Kon / stock.adobe.com.

## Selektive Translation *reloaded*: alternative Ribosomen in Mykobakterien

**In vielen Bakterien findet man Mehrfachkopien von Genen, die für ribosomale RNA und Proteine codieren, sich aber durch Sequenzvariationen auszeichnen. Infolge dieser kleinen aber feinen Unterschiede besitzen Zellen ein Gemisch verschiedener Ribosomensubtypen mit spezifischen Translationsprofilen. Während das Phänomen bereits für Gram-negative Bakterien beschrieben wurde, zeigt eine aktuelle Arbeit, dass auch Gram-positive Mikroorganismen die Vorteile der selektiven Translation in eigener Weise nutzen.**

■ In der Maiausgabe des BIOSpektrums 2019 (Lassak J, BIOSpektrum (2019) 3:291) berichtete ich über zwei Arbeiten (Kurylo CM *et al.*, Cell Rep (2018) 25:236–248; Song W *et al.*, Nat Microbiol (2019) 4:515–526), die Ribosomenheterogenität in *Escherichia coli* respektive *Vibrio vulnificus* beschreiben. Eine

aktuelle Studie (Chen YX *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA (2020) 32:19487–19496) schildert das Phänomen für *Mycobacterium smegmatis*, einen harmlosen Verwandten des Erregers der Tuberkulose. Während sich die beiden früheren Publikationen auf Variationen in der ribosomalen RNA konzentrierten, wird hier die Bedeutung paraloger ribosomaler Proteine (AltRPs) bei der Bildung alternativer Ribosomen beleuchtet. Eine gut charakterisierte Gruppe solcher AltRPs sind diejenigen, die sich in Bezug auf den Cysteingehalt von ihren ursprünglichen Gegenstücken unterscheiden. Während cysteinreiche Abschnitte charakteristisch für die kanonische Form sind, fehlen entsprechende Sequenzmotive in den AltRPs. Dennoch werden auch AltRPs in Ribosomen verbaut, die man aber bislang für translationsinaktiv hielt. Dass es sich hierbei um einen Irrtum handelt, demonstrieren Chen *et al.* in-

dem sie Übersetzungsaktivität anhand eines Translationssystems zeigen, das sie mit einem AltRP als Baustein rekonstituierten. Mehr noch, die Translationsprofile dieser alternativen Ribosomen sind signifikant unterscheidbar von denen, die mit herkömmlichen Ribosomen erzeugt werden. Phänotypische Untersuchungen deuten darauf hin, dass dies insbesondere für optimales Wachstum unter Eisenmangel wichtig ist.

→ *Damit scheinen sowohl die Sequenzvariationen in den multiplen Kopien ribosomaler DNA als auch paraloger ribosomaler Proteine Anpassungen an bestimmte Stresssituationen zu sein. Alternative Ribosomen erweitern so das Regulationsportfolio von Bakterien um einen weiteren, bislang wenig beleuchteten Aspekt.*

**Jürgen Lassak** ■



## Kleine Schere mit großer Wirkung

**Die Entdeckung der adaptiven CRISPR-Immunsysteme von Mikroorganismen hat zu einer Revolution in der Manipulation von Genomen geführt. Diverse CRISPR-Systeme prokaryotischen Ursprungs werden seither als vielfältige Werkzeuge zur Genmanipulation eingesetzt. Es werden stetig neue Systeme untersucht, auch um möglicherweise kompaktere und solidere Enzyme entdecken zu können.**

■ Patrick Pausch *et al.* (Science (2020) 369:333–337) berichten von einem neuartigen CRISPR-System, aus Genomen von Riesenviren der Familie der Biggiephagen. Wie auch für andere CRISPR-Systeme gezeigt, funktioniert CRISPR-Cas $\Phi$  durch das Erkennen CRISPR-RNA(crRNA)-komplementärer Sequenzen in DNA, um zielgenau fremde Phagen zu zerstören. Während der bisher kom-

pakteste Cas9-Komplex aus einem etwa 120 kDa großen Enzym und zwei crRNA-Komponenten besteht, ist Cas $\Phi$  mit seiner etwa 70 kDa großen Nuklease und einer crRNA nur etwa halb so groß. Trotz dieser Reduktion kann Cas $\Phi$  in seinem aktiven Zentrum sowohl crRNA aus *precursor-crRNA* (CRISPR-Array-Transkript) erzeugen als auch DNA schneiden. Damit handelt es sich hierbei um das derzeit kleinste bekannte CRISPR-System. Um nicht das eigene Genom durch Anvisieren des CRISPR-Arrays zu zerschneiden, erkennen CRISPR-Komplexe eine kurze PAM-Sequenz (*protospacer adjacent motif*), die nicht im CRISPR-Array vorkommt. Pausch *et al.* identifizierten das PAM mittels einer Plasmidbibliothek als 5'-TBN-3' (B = G, T oder C). Die Autoren zeigen, dass Cas $\Phi$  sowohl in *Escherichia coli* als auch in kultivierten humanen Nierenzellen

(HEK293) und in Pflanzenzellen von *Arabidopsis thaliana* erfolgreich DNA erkennen und schneiden kann.

→ *Diese Kombination aus kompaktem CRISPR-System, minimalen PAM und der bekannten Steuerbarkeit über ein CRISPR-Array ermöglicht die Entwicklung eines neuen, noch vielfältiger einsetzbaren, Genmanipulations-Werkzeuges. Insbesondere könnte die geringere Größe es ermöglichen, dieses CRISPR-System leichter in eukaryotische Viren einzubauen, die dann als Vektoren verwendet werden können, um schwer zugängliche eukaryotische Zellen zu erreichen und zu manipulieren. Die geringere Größe des Cas $\Phi$  könnte zudem ermöglichen, durch Sekundärstrukturen besser geschützte DNA-Abschnitte zu erkennen und zu schneiden.*

Nils Mais und Gert Bange ■

## Heart-on-a-chip als neuer Ansatz für die Ischämieforschung

**Ischämische Herzerkrankungen führen durch einen verminderten Blutfluss zu einer Unterversorgung des Herzwebes mit Sauerstoff. Dies führt zu einer Beeinträchtigung der Herzfunktion, was z. B. Herzrhythmusstörungen und Herzinsuffizienz als Folge haben kann. Bis heute steigt die Zahl an ischämiebedingten Todesfällen weltweit, während viele Fragen über die Auswirkungen einer Ischämie auf Herzzellen auf zellulärer Ebene ungeklärt sind.**

■ Unter hypoxischen Bedingungen verändert sich das Verhalten von Kardiomyozyten (KM). Bisher existiert jedoch kein optimales Modell für die Untersuchung dieser ischämischen Veränderungen. Um die Auswirkungen einer Hypoxie auf die Funktion des Herzwebes zukünftig besser untersuchen zu können haben H. Liu *et al.* (Nano Lett (2020) 20:2585–2593) ein *Heart-on-a-chip*-Modell erstellt. Dabei handelt es sich um ein System, in dem KM auf einem Chip mit Nanosäulen kultiviert werden und durch elektrische Sensoren untersucht werden können. Dieses Modell soll für

die Simulation verschiedener Auswirkungen einer Hypoxie mit anschließender Reperfusion benutzt werden. Durch Modulierung des Sauerstoffgehalts im Kulturmedium simulierten Liu *et al.* normoxische (21 % O<sub>2</sub>) und hypoxische (1–4 % O<sub>2</sub>) Bedingungen. Für die Versuche wurden murine, atriale HL-1-Zellen gewählt. Diese Zellen weisen unter Ischämie und Reperfusion ein ähnliches Verhalten wie primäre KM auf. Über immunohistochemische Nachweise konnten ausgeprägte Aktinstrukturen und eine hohe Expression von Connexin-43 in den kultivierten Zellen festgestellt werden. Dies spricht für den Erhalt des Cytoskeletts und der elektrischen Leitfunktion der Zellen.

Um die Eignung dieses Modells für zukünftige Untersuchungen an zellulären Antworten unter Hypoxie zu untersuchen, wurde zunächst die Expression des Transkriptionsfaktors *Hypoxia-inducible factor-1-alpha* (HIF-1 $\alpha$ ) nach Inkubation der Zellen in hypoxischem Medium für fünf Stunden überprüft. HIF-1 $\alpha$  ist ein wichtiger Regulator für die zelluläre Antwort auf Sauerstoff-Unterversorgung. Wie erwartet

wurde HIF-1 $\alpha$  unter Hypoxie stärker exprimiert. Die Expression fiel nach einer Inkubation in normoxischem Medium für 90 min. wieder auf den Basalwert. Die Inkubation mit hypoxischem Medium bewirkt zudem eine nachweisliche Veränderung der Schlagfrequenz und eine verringerte, nicht uniforme Ausbreitungsgeschwindigkeit der elektrischen Impulse. Wie erwartet zeigten sich ebenfalls eine Verkürzung der Aktionspotentiale sowie längere Intervalle zwischen diesen. Eine Reperfusion ermöglicht eine Rückkehr zur Ausgangsfrequenz. Dieser Verlauf wurde ebenfalls in KM aus murinen Primärkulturen beobachtet.

→ *Liu et al. haben ein Ischemia-on-a-chip-Modell kreiert, mit dem eine Hypoxie simuliert und verschiedene Auswirkungen auf die Zellfunktion untersucht werden können. Hierbei bleibt die native Zellstruktur erhalten und sowohl einzelne Zellen als auch mehrere Zellen können simultan gemessen werden. Zukünftig kann dieses Modell modifiziert werden, um neben einer Hypoxie weitere Effekte einer Ischämie, wie z. B. eine Azidose, zu untersuchen.*

Daniela Kruck ■

- ▶ Nanohaloarchaen als Juniorpartner beim Chitinabbau
- ▶ Kryo-EM-Einzelpartikelanalyse eines Membrantransporters in Liposomen
- ▶ Pilzinfektionen haben weitreichende Folgen für das pflanzliche Immunsystem
- ▶ Stickstofffixierung: Freundschaft oder Knechtschaft?

## Nanohaloarchaen als Juniorpartner beim Chitinabbau

**Hypersaline Gewässer beherbergen neben zahlreichen Prokaryoten, Pilzen, Algen und Protisten oft auch Arthropoden. Deren Exoskelett besteht aus Chitin, das somit eines der häufigsten Biopolymere in diesem Lebensraum ist. Viele halophile Prokaryoten haben sich daher auf den Chitinabbau spezialisiert. Eine Partnerschaft mit Nanohaloarchaen, die zum weit verbreiteten, aber bisher kaum erforschten Superphylum DPANN gehören, erweitert das Nahrungsspektrum und hilft, Chitin-lose Zeiten zu überstehen.**

■ Violetta La Cono *et al.* (Proc Natl Acad Sci USA (2020) 117:20223–20234) isolierten aus der Salina della Laguna auf Sizilien das chitinolytische, aerobe Euryarchaeon *Halomicrobium* sp. LC1Hm. Während LC1Hm sowohl alleine als auch zusammen mit dem ektosymbiontischen, mikroaerotoleranten Nanohaloarchaeon *Candidatus* Nanohalobium

constans LC1Nh kultiviert werden kann, ist LC1Nh obligat auf Vertreter der Gattung *Halomicrobium* angewiesen. *Halomicrobium* kann Chitin sowohl in Reinkultur als auch in Kokultur extrazellulär abbauen. In Kokultur kann es darüber hinaus  $\alpha$ -Glucane wie Stärke und Glykogen nutzen. Gemäß Genomsequenz ist *Halomicrobium* ein typisch heterotroph und kann alle zum Leben benötigten Verbindungen selbst herstellen. *Nanohalobium* hingegen ist auxotroph für Aminosäuren, Nukleotide, Lipide und Coenzyme. Sein Stoffwechsel ist fermentativ: Extrazelluläre Enzyme zerlegen  $\alpha$ -Glucane. Zucker werden über die Glykolyse zu Laktat, Ethanol, Acetat und Malat abgebaut. Die Anheftung an den Wirt dürfte über Pili-ähnliche Archaeellen erfolgen. Vielfalt-generierende Retroelemente (DGRs), also. Retrotransposons, die durch gezieltes Springen in ihre Zielgene (mutagenes Retrohoming) genetische Vielfalt erzeugen können, helfen

wahrscheinlich dabei, sich stets rasch an den Wirt anzupassen.

→ *Nanohalobium* nutzt das beim Chitinabbau durch *Halomicrobium* gebildete *N-Acetylglucosamin* zur Energiegewinnung und erhält darüber hinaus zahlreiche Stoffwechselbausteine. *Halomicrobium* wiederum profitiert von der Fähigkeit seines Ektosymbionten,  $\alpha$ -Glucane abzubauen. Diese werden möglicherweise von Algen gebildet, die höhere Salzkonzentrationen ertragen als Arthropoden. Bemerkenswert ist, dass *Halomicrobium* das Chitin nicht nur extrazellulär in kleine Bruchstücke zerlegt; auch der Abbau zu Monomeren erfolgt extrazellulär, sodass sich *Nanohalobium* an der Mahlzeit beteiligen kann. Vorteilhaft dürfte die Partnerschaft von *Halomicrobium* mit *Nanohalobium* vor allem unter schwankenden Salzkonzentrationen sein, wenn Chitin nicht dauerhaft verfügbar ist.

Johannes Sander ■

## Kryo-EM-Einzelpartikelanalyse eines Membrantransporters in Liposomen

**Membranproteine sind sehr häufig (etwa 30 % im gesamten Proteom) und spielen eine essenzielle Rolle bei verschiedenen zellulären Prozessen wie z. B. das Aufrechterhalten der elektro-chemischen Gradienten. Aufgrund ihrer Beteiligung in pathologischen Prozessen (z. B. als Membrantransporter, die eine multidrug-Toleranz von Krankheitserregern oder Krebszellen verursachen) sind Membranproteine in den Fokus der biomedizinischen Forschung gerückt und stellen ein bedeutendes molekulares Ziel für Wirkstoffe dar.**

■ Durch Untersuchungen der Proteinstruktur können wichtige Rückschlüsse auf die spezifische Funktion des Proteins gezogen werden. Je besser die Erkenntnisse der Strukturanalyse, desto genauer die Vorhersagen zur Rolle des Proteins im gesunden oder kranken Organismus. Seit Jahren war Röntgenkristallographie fast die einzige Methode für die Strukturanalyse von Membranproteinen, trotz mehrerer Herausforderungen, z. B. dass sie riesige Proteinmengen braucht und nicht für jedes Protein anwendbar ist. Seit die Kryo-Elektro-

nenmikroskopie (Kryo-EM) vor einigen Jahren glücklicherweise eine Revolution in der Auflösung erfahren hat, ist sie zurzeit zu einem beliebten und leistungsstarken Werkzeug für Strukturuntersuchungen von Membranproteinen geworden. Eine neue Studie von X. Yao *et al.* (Proc Natl Acad Sci USA (2020) 117:18497–18503) demonstrierte einen neuen Ansatz der Kryo-EM Einzelpartikel Strukturanalyse (*single particle analysis*) des in Liposomen eingebetteten bakteriellen Multidrug-Exporters AcrB. Die Autoren wendeten während des Workflows eine Kombination aus mehreren Optimierungsschritten an, die es ermöglichten, eine endgültige Auflösung der AcrB-Rekonstruktion in Proteoliposomen von 3.9 Å zu erreichen. Erstens verbesserten sie Schritte der Proteinrekonstitution in Liposomen und die verwendeten Reinigungstechniken, um eine homogene Mischung von Liposomen zu erhalten. Zweitens nutzten sie *graphen-cryogrids*, Objektträger, die für eine bessere Probenabbildung in der Kryo-EM dienen. Darüber hinaus implementierten sie einen neuen Ansatz in der Bildverarbeitung zur

effizienteren Anreicherung geeigneter Partikel für die dreidimensionale (3D) Rekonstruktion der Proteinstruktur. All diese Verbesserungen des Arbeitsablaufs ermöglichten es, die Struktur des in der Lipiddoppelschicht enthaltenen AcrB, unter Verwendung von Kryo-EM Einzelpartikelanalyse zu untersuchen. Die im Artikel vorgestellte Technik erlaubte es sogar einige zusätzliche Merkmale zu detektieren, beispielsweise den Einfluss der Membrankrümmung auf die Proteinkonformation.

→ *Die Arbeit ist ein weiterer Fortschritt für Kryo-EM-Untersuchungen von Membranproteinen unter nahezu nativen Bedingungen. Es wäre außerdem erstrebenswert zu testen, ob der vorgestellte Workflow für andere Membranproteine als AcrB anwendbar ist. Darüber hinaus wäre es interessant, verschiedene Zustände eines solchen Membrantransporters in der Lipiddoppelschicht während seines Arbeitszyklus zu erfassen. Die vorliegende Studie eröffnet neue Horizonte in Strukturstudien von Membranproteinen und bietet Raum für vielversprechende Methodenentwicklung.*

Dmitry Shvarev ■

## Pilzinfektionen haben weitreichende Folgen für das pflanzliche Immunsystem

**Pflanzen sind kontinuierlich den Angriffen von pathogenen Mikroben ausgesetzt, die diese meist erfolgreich abwehren. Spezialisierte Pathogene können jedoch mit ausgeklügelten molekularen Mechanismen die pflanzliche Immunabwehr umgehen. Dann kommt es zu Infektionssymptomen sowie mitunter zur starken Schädigung der Pflanze bis hin zum Absterben.**

■ Der Pilz *Zymoseptoria tritici* löst in Weizen die Blattdürre aus, die in Anbaugebieten auf der gesamten Welt zu Ertragsverlusten von bis zu 50 Prozent führt. Heike Seybold *et al.* (Nat Commun (2020) 11:1910) nutzten Ko-Infekti-

onen dieses Pilzes mit Varianten des Bakteriums *Pseudomonas syringae* sowie Metabolom- und Mikrobiomstudien, um die Auswirkungen der Pilzbesiedlung auf das pflanzliche Immunsystem zu untersuchen. Die Autorinnen zeigen, dass eine bestehende Pilzbesiedlung sekundäre Infektionen selbst von ansonsten apathogenen *P. syringae*-Varianten begünstigt. Dies beobachteten sie auch bei Infektion unterschiedlicher Blätter, was auf eine systemische Reaktion der Pflanze hindeutet. Zugrunde liegt eine Manipulation der Biosynthese von pflanzlichen Abwehrstoffen durch den Pilz. Damit unterdrückt er die pflanzliche Im-

munabwehr. Im Gegenzug induziert der Pilz in resistenten Pflanzen die Abwehr, was die Vielfalt der bakteriellen Besiedlung deutlich reduziert.

→ Häufig sind Infektionsstudien auf binäre Wirt-Pathogen-Interaktionen beschränkt. Die Autorinnen untersuchen in einem eleganten Ansatz den Einfluss von Pilzinfektionen auf die weitere Besiedlung der Pflanze. Der Nachweis einer systemischen Schwächung des pflanzlichen Immunsystems stellt einen wichtigen Schritt für die Etablierung neuer Strategien im Pflanzenschutz dar.

**Kerstin Schipper** ■

## Stickstofffixierung: Freundschaft oder Knechtschaft?

**Rhizobien fixieren Stickstoff in Symbiose mit Pflanzen. Versuche, diese Fähigkeit künstlich auf andere Organismen zu übertragen, erreichten nie die Effizienz der natürlichen Symbiose, da wichtige Bestandteile unbekannt sind.**

**Stickstofffixierung durch Symbiose wird oft mit einer Vereinbarung verglichen, bei der fixierter Stickstoff gegen Kohlenstoff getauscht wird. Carlos E. Flores-Tinoco *et al.* (Mol Syst Biol (2020) 16:e9419) zeigen ein anderes Bild, bei der die Pflanze die Bakterien in eine Falle lockt und Stickstofffixierung durch Bereitstellung bestimmter Metabolite erzwingt.**

■ Um die niedrige Sauerstoffkonzentration und den niedrigen pH in der Umgebung zu überleben, müssen die Bakterien atmosphärischen Stickstoff durch Nitrogenase-Enzyme

fixieren, die sehr viel Energie beanspruchen. Der niedrige pH wird demzufolge neutralisiert; als Abfallprodukt entsteht Ammonium. Laut Studie stellt die Pflanze zwei Metabolite bereit: Succinat und die stickstoffreiche Aminosäure Arginin. Sowohl der Stoffwechsel von



**Abb.:** Knöllchenbakterien (blau) in einer Pflanzenwurzel. Braun sichtbar sind pflanzliche Proteine, kolorierte elektronenmikroskopische Aufnahme. Bild: ETH Zürich / Anne Greet Bittermann.

Succinat als auch der von Arginin (CATCH-N) erfüllen den bakteriellen Verbrauch an Stickstoff und generieren ein hohes ATP-Niveau, wie es die Nitrogenase benötigt. Die Relevanz des CATCH-N-Systems spiegelt sich in der enormen Anzahl an Genen, die mindestens zehn Transportsysteme und 23 Enzyme mit stark überschneidenden Funktionen codieren.

→ Die Studie verdeutlicht, wovon eine Übertragung auf andere Organismen abhängt: Die Pflanze muss neben Aufrechterhaltung einer bestimmten Umgebung auch Metabolite bereitstellen, damit die Bakterien anfangen, Stickstoff zu fixieren, um zu überleben. Das Endprodukt Ammoniak ist ein Abfallprodukt für die Bakterien, aber eine wertvolle Ressource für die Pflanze.

**Matthew McIntosh, Jonas Kretz** ■

Prof. Dr. Volkmar Braun, Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie, Spemannstraße 35, D-72076 Tübingen, volkmar.braun@tuebingen.mpg.de

Prof. Dr. Heike Brötz-Oesterhelt, Interfakultäres Institut für Mikrobiologie und Infektionsmedizin, Universität Tübingen, Auf der Morgenstelle 28/E7, D-72076 Tübingen, heike.broetz-oesterhelt@uni-tuebingen.de

Dr. Jonathan Wolf Mueller, University of Birmingham, Institute of Metabolism and Systems Research (IMSR) and Centre for Endocrinology, Diabetes and Metabolism (CEDAM), IBR Tower, Birmingham B15 2TT, UK, J.W.Mueller@bham.ac.uk

Prof. Dr. Jürgen Lassak, LMU München, Biozentrum Department Biologie I, Mikrobiologie, Großhaderner Straße 2-4, D-82152 Planegg-Martinsried, juergen.lassak@lmu.de

Nils Mais, Dr. Gert Bange, LOEWE Zentrum für synthetische Mikrobiologie (SYNMIKRO), Hans-Meerwein-Straße, D-35043 Marburg, gert.bange@synmikro.uni-marburg.de

Dr. Johannes Sander, Falkenstraße 87, D-58553 Halver, jtsander@gmx.de

Dr. Kerstin Schipper, Universität Düsseldorf, Institut für Mikrobiologie, Universitätsstraße 1, D-40225 Düsseldorf, schipper@hhu.de

Dr. Matthew McIntosh, Jonas Kretz, Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie, Universität Gießen, Heinrich-Buff-Ring 26-32, D-35392 Gießen, matthew.mcintosh@mikro.bio.uni-giessen.de

■ **Autoren aus der jGBM** 

Khadija Aichane, Medizinische Hochschule Hannover, Carl-Neuberg-Straße 1, D-30625 Hannover, Khadija.Aichane@stud.mh-hannover.de

Daniela Kruck, Medizinische Hochschule Hannover, Institut für Neurophysiologie, Carl-Neuberg-Straße 1, D-30625 Hannover, kruck.daniela@mh-hannover.de

Dmitry Shvarev, Max-Planck-Institut für Biophysik, Max-von-Laue-Straße 3, D-60438 Frankfurt a. M., dmitryshvarev@gmail.com