

Manfred Grieshaber

**August-Wilhelm Alfermann, Michael Bott, Karl-Erich Jaeger,
Wolfgang Kläui, Hermann Sahn, Heinrich Strotmann, Hanns Weiss,
Peter Westhoff und Günter Wulff**

Das Graduiertenkolleg „Molekulare Physiologie: Stoff- und Energieumwandlung“

Die Überlebensfähigkeit von Organismen hängt entscheidend davon ab, wie sie auftretende Veränderungen der Umwelt wahrnehmen und mit welchen physiologischen und biochemischen Mechanismen sie darauf reagieren. Nur wenn sie sich an ihre Umwelt anpassen, können sie überleben und sich vermehren bzw. fortpflanzen. Die Anpassung eines Phänotyps an eine gegebene oder sich ändernde Umwelt wird gleichermaßen von Bakterien, Pflanzen und Tieren gefordert und spiegelt sich unter anderem in den Reaktionen des Stoffwechsels, in Transportphänomenen und in den Wegen der Energiebereitstellung wider. Die Mitglieder des Graduiertenkollegs „Molekulare Physiologie: Stoff- und Energieumwandlung“ widmen sich mit ihren Doktorandinnen und Doktoranden dieser Thematik. Die Themen ihrer Dissertationen werden zunächst unter dem Aspekt der grundlegenden und zweckfreien Forschung konzipiert. Die technische Anwendung wird dann verfolgt, wenn die Ergebnisse eine industrielle oder medizinische Verwertbarkeit erkennen lassen.

Neben ihren ureigenen Themen, mit deren Bearbeitung die Graduierten eine Fragestellung der Physiologie und Biochemie von Bakterien, Pilzen und Tieren beantworten oder ein grundlegendes biologisches Phänomen modellartig chemisch simulieren, sollen die Stipendiatinnen und Stipendiaten sich in zusätzlichen Studien den weiterführenden Fragestellungen des Kollegs widmen. So wurden in den vergangenen acht Jahren aus diesem Kolleg 57 Graduierte (30 Doktorandinnen und 27 Doktoranden) mit meist recht speziellen Dissertationen promoviert. Alle Promovierten sind, soweit sich ihre Spuren verfolgen lassen, in der freien Wirtschaft oder an einer Hochschule tätig.

Molekulare Mechanismen der Stoffumwandlung

Viele Bakterien, unter anderem auch das aus der großtechnischen Herstellung der Aminosäure und des Geschmackverstärkers Glutamat bekannte *Corynebacterium glutamicum*, erkennen Umweltänderungen mit ihren so genannten Zweikomponenten-Signaltransduktionssystemen, die aus zwei modular aufgebauten Proteinen, einer Sensorkinase und einem Antwortregulator bestehen. Erkennt die Rezeptordomäne der Sensorkinase einen Reiz (z. B. Citrat, das Salz der Zitronensäure), so wird ein Histidinrest in der Transmitterdomäne des Proteins autophosphoryliert. Die Phosphorylgruppe wird anschließend auf einen Aspartatrest in der Empfängerdomäne des Antwortregulators übertragen und aktiviert bzw. deaktiviert dieses Protein, das in der Regel als Transkriptionsregulator fungiert

(Abb. 1 A). *Corynebacterium glutamicum*, ein gram-positives Bodenbakterium, besitzt 13 verschiedene Zweikomponentensysteme für die Interaktion mit seiner Umwelt. Die spezifischen Funktionen dieser Systeme werden von Michael Bott und seinen Stipendiatinnen Tanja Gerharz und Mirja Wessel mittels der funktionellen Genomanalyse aufgeklärt. Dazu werden Deletionsmutanten konstruiert und ihre Eigenschaften mit denen des Wildtypstammes verglichen. Besonders hilfreich ist dabei die DNA-Chip-Analyse, die es erlaubt, Unterschiede in der Genexpression gleichzeitig für alle ca. 3.000 Gene dieses Bakteriums zu bestimmen. Aber auch die gezielte Suche nach einem bestimmten Phänotyp der Mutanten führte zum Erfolg. Mittlerweile konnten für mehrere Zweikomponentensysteme klare Hinweise auf ihre physiologischen Funktionen gewonnen werden. So erkennt z. B. das PhoS-PhoR-System Phosphat-Mangelbedingungen und induziert ein hochaffines Phosphat-Aufnahmesystem sowie Enzyme und Transportproteine, die der Zelle organische Phosphatquellen, wie z. B. Glycerin-3-phosphat, zur Verfügung stellen.¹ Das CitA-CitB-System erkennt die Anwesenheit von Citrat im Medium und induziert einen Citrattransporter, der es der Zelle ermöglicht, diese Kohlenstoffquelle aufzunehmen und zu verwerten.² Die Stipendiatin Mirja Wessel konnte zeigen, dass der Antwortregulator CgtR4 essentiell für *C. glutamicum* ist und fand Hinweise dafür, dass dieses Protein eine Rolle bei der generellen Stressantwort spielt.

Aber nicht nur Glutamat, sondern auch andere Aminosäuren wie L-Lysin werden mittels *Corynebacterium glutamicum* industriell hergestellt. Diese Aminosäuren werden zur Verbesserung der Qualität von Grundnahrungsmitteln und Futtermitteln eingesetzt. Sie sind von großer wirtschaftlicher Bedeutung; ihr Bedarf nimmt stetig zu, und zurzeit werden mehr als $1,5 \times 10^6$ Tonnen Aminosäuren mikrobiell produziert. Während des Syntheseprozesses verwertet *Corynebacterium glutamicum* billige Zucker und wandelt diese in wertvolle Aminosäuren um (Abb. 1 B). Die Doktorandinnen und Doktoranden Andre Drysch, Nicole Kennerknecht, Sören Petersen, Eva Radmacher, Petra Simic, Corinna Stansen und Andrea Veit um Hermann Sahn konnten am Institut für Biotechnologie mit modernen Methoden der Molekularbiologie Bakterienstämme entwickeln, bei denen die Regulationsmechanismen der Synthesewege ausgeschaltet sind, wodurch die gewünschten Aminosäuren von den Bakterien in großen Mengen synthetisiert und ausgeschieden werden. Dabei gilt das besondere Interesse der Untersuchung von intrazellulären Metabolitflüssen,³ den Grundlagen zur Zellwandsynthese und den Transportprozessen von Aminosäuren. Kürzlich gelang es der Stipendiatin Nicole Kennerknecht, den Exportcarrier der essentiellen Aminosäure L-Isoleucin zu identifizieren und zu charakterisieren.⁴ Er besteht aus zwei Proteinen, deren Bildung auf der Expressionsebene durch einen Regulator kontrolliert wird. Überraschenderweise liegen in den Genomsequenzen vieler Bakterien und Archaea Gene vor, die für sehr ähnliche Transportproteine kodieren. Offensichtlich ist diese neuartige Proteinfamilie weit verbreitet und am Transport kleiner hydrophober Substanzen beteiligt.

Nicht immer sind Enzyme, so wie sie natürlicherweise in einem Organismus vorkommen, für den technischen Einsatz gut geeignet. Ein besonderes Beispiel bearbeiten Su-

¹ Vgl. Ishige *et al.* (2003).

² Vgl. Gerharz *et al.* (2003).

³ Vgl. Petersen *et al.* (2003).

⁴ Vgl. Kennerknecht *et al.* (2002).

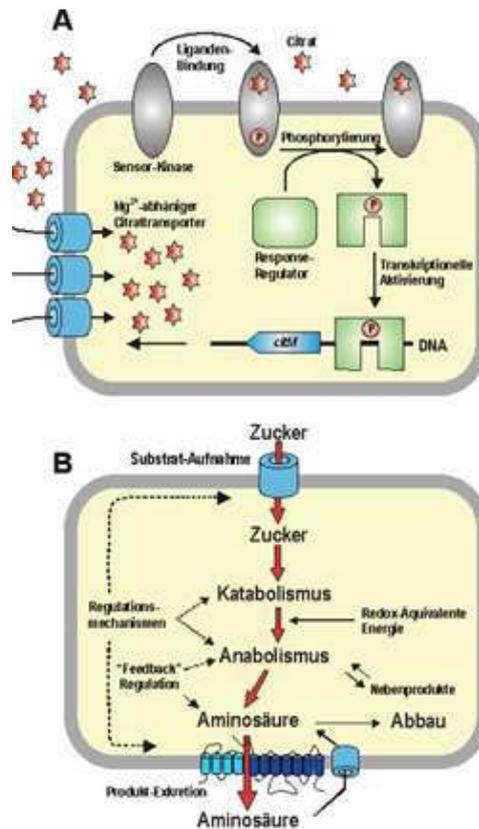


Abb. 1: (A) Modell der Wirkungsweise für das CitAB-Zweikomponentensystem von *Corynebacterium glutamicum*. Die Sensorkinase bindet Citrat und gibt die Information in das Zellinnere weiter, wo die Transkription der DNA aktiviert wird und zur Expression des Citrattransporters führt. (B) Relevante Prozesse bei der Synthese einer Aminosäure aus extern angebotenem Zucker in *C. glutamicum*.

sanne Aileen Funke und ihr Doktorvater Karl-Erich Jaeger. Sie interessieren sich für ein Enzym, das niedermolekulare Substanzen unterscheiden kann, die zwar in ihrer Zusammensetzung identisch sind, sich aber nicht miteinander zur Deckung bringen lassen; sie verhalten sich wie Bild und Spiegelbild. Man bezeichnet solche Substanzen als Enantiomere, die auch unter pharmakologisch interessanten Verbindungen auftreten. Meist ist aber nur ein Enantiomer wirksam und es muss deshalb in reiner Form isoliert werden. Die biokatalytische Produktion enantiomerenreiner Komponenten gewinnt sowohl für die chemische als auch für die pharmazeutische Industrie immer mehr an Bedeutung. Für die Herstellung dieser Substanzen verwendet man ebenfalls Enzyme. Leider ist die Enantioselektivität von Enzymen gegenüber biotechnologisch interessanten, aber meist unnatürlichen Substraten häufig gering. Die neue Methode der gerichteten Evolution kann jedoch benutzt werden, die Eigenschaften eines Enzyms nach den biotechnischen Erfordernissen zu optimieren. Hierbei werden zufällige Mutationen in das entsprechende Gen des Enzyms eingefügt und nachfolgend mit einer geeigneten Suchmethode in einer Bibliothek aus Enzymvarianten diejenigen mit der gewünschten Eigenschaft identifiziert.⁵ In dem von der Stipendiatin Susanne Aileen Funke bearbeiteten Projekt soll die Enantioselektivität der

⁵ Jaeger *et al.* (2001).

Lipase aus *Bacillus subtilis* für die asymmetrische Hydrolyse des Modells substrates *meso*-1,4-Diacetoxy-2-cyclopenten verbessert werden. Als Produkte dieser Reaktion entstehen chirale Alkohole, die massenspektroskopisch voneinander unterschieden werden können, weil ein deuteriummarkiertes Modells substrat verwendet wird. Durch den Einsatz zufälliger Mutagenesemethoden allein konnte das Enzym aber nur unzureichend optimiert werden.⁶ Daher wurde ein neuer Ansatz für die gerichtete Evolution enantioselektiver Enzyme gewählt. Mit der Lipase A von *Bacillus subtilis* wurde eine komplette Sättigungsmutagenese durchgeführt, wobei jede einzelne in der Lipase A vorhandene Aminosäure gegen die verbleibenden 19 anderen in Lebewesen vorkommenden Aminosäuren ausgetauscht wurde. Im anschließenden Screening konnten verschiedene Lipase A-Varianten mit einer gesteigerten Enantioselektivität gegenüber dem Modells substrat identifiziert werden. Diese Varianten werden zurzeit mit einer neu entwickelten Methode miteinander rekombiniert, um die Enantioselektivität weiter zu steigern. Die so erhaltenen enantioselektiven Enzyme werden gereinigt, biochemisch charakterisiert, kristallisiert und ihre Röntgenstruktur aufgeklärt.

Während die Mechanismen der Anpassung an die Umwelt bei Bakterien meist nur von Mikrobiologen erkannt werden, sind bei Pflanzen viele dieser Reaktionen auch für den Laien auffällig und leicht zu beobachten. Wenn die Sonneneinstrahlung während der Mittagshitze zu groß wird, stellt der Stachellattich (*Lactuca serriola*) seine Blätter so, dass sie kaum von den Sonnenstrahlen getroffen werden. In der Wüste bilden manche Gewächse gar keine Blätter aus und sparen das wenige, in verdickten Sprossen gespeicherte Wasser. Dornen und Stacheln schützen viele Pflanzen vor Fress- und Pflückfeinden. Manche Wiesenpflanzen, wie das Jakobskreuzkraut (*Senecio jacobaea*) oder der Eisenhut (*Aconitum napellus*), meidet das Vieh. Offensichtlich sind diese Blumen giftig. Zu den äußerst wirkungsvollen Schutzeinrichtungen der Pflanzen gehören aber nicht nur Gifte, sondern auch Signalstoffe, die über die Luft oder das Wasser abgegeben werden. Lockstoffe ziehen Insekten als Bestäuber an, Abwehrstoffe verhindern die Besiedlung des eine Pflanze umgebenden Areals mit anderen Gewächsen. Viele dieser chemischen Verbindungen werden als so genannte sekundäre Pflanzenstoffe in speziellen und komplizierten Stoffwechselwegen synthetisiert. Seit Jahrhunderten werden sie in der Medizin verabreicht.

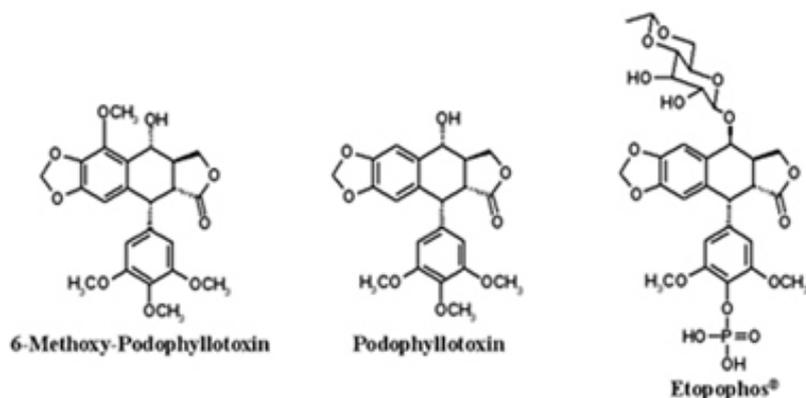


Abb. 2: Lignane aus dem Weißen Lein (*Linum album*) und ein semisynthetisches Derivat des Podophyllotoxins Etopophos[®].

⁶ Vgl. Funke *et al.* (2003).

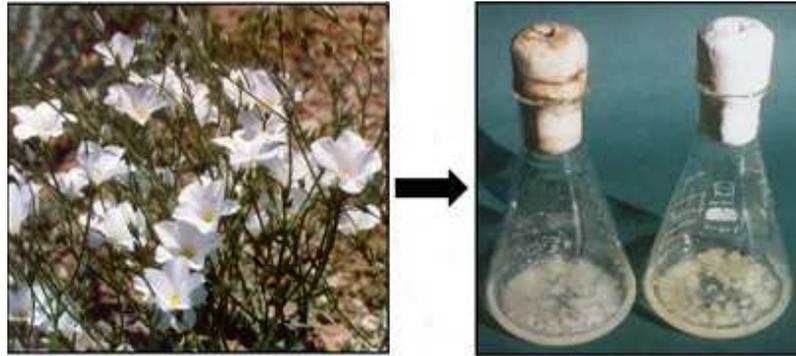


Abb. 3: Der Weiße Lein. Eine Pflanze mit Blüten und Zellsuspensionskulturen (rechts).

Auch heute noch sind Pflanzen oft die einzige Rohstoffquelle für wichtige Arzneistoffe. So stammen mehrere der in der Tumorthherapie verwendeten Substanzen aus Pflanzen, wie z. B. das Podophyllotoxin. Es wird, weil die chemische Synthese zu teuer ist, aus den Wurzelstöcken der in Asien beheimateten Maiapfelpflanze (*Podophyllum hexandrum*) isoliert. Da man jedoch diese Pflanze bisher nicht anbauen kann, sind ihre Bestände bedroht.

A. W. Alfermann untersucht deshalb mit den Stipendiatinnen Katja Federolf, Alexandra Henges und Cosima von Heimendahl sowie dem Stipendiaten Jörg Windhövel die Biosynthese von Podophyllotoxin und seinen Derivaten in Zellkulturen (Abb. 2). Hierzu haben sie Zellsuspensions- bzw. Wurzelkulturen des im Iran beheimateten Weißen Leins (*Linum album*, Abb. 3) etabliert, die innerhalb von zwei Wochen bis ein Prozent Podophyllotoxin bzw. über 2,5 Prozent 6-Methoxypodophyllotoxin akkumulieren. Der Maiapfel dagegen braucht über zwei Jahre, bis in seinen Wurzeln der Arzneistoffgehalt vergleichbar hoch ist.

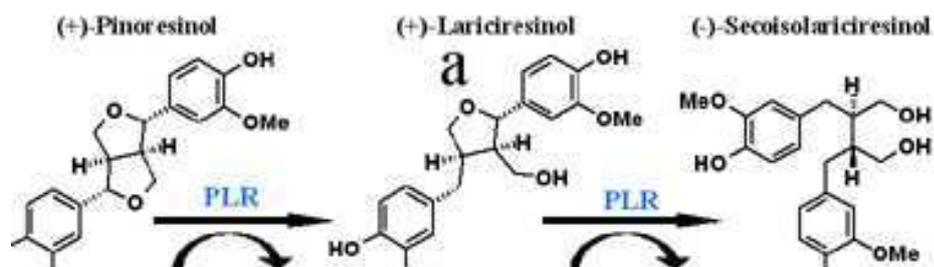


Abb. 4: Die von der Pinoresinol-Lariciresinol-Reduktase (PLR) katalysierten Reaktionen, die zur Synthese von (-)-Secoisolariciresinol führen.

Zusätzlich wird nach den an der Biosynthese beteiligten Enzymen bzw. deren Genen gesucht. So beschäftigt sich Cosima von Heimendahl mit einem wichtigen Schritt zu Beginn der Podophyllotoxinbiosynthese, nämlich der Reduktion von Pinoresinol über Lariciresinol zu Secoisolariciresinol (Abb. 4). Inzwischen wurde die cDNA des beteiligten Gens in ein Bakterium transferiert, das jetzt wie der Weiße Lein aus Pinoresinol das Secoisolariciresinol bilden kann. Ein weiterer Schritt in der Biosynthese des Podophyllotoxins kann durch die Desoxypodophyllotoxin-7-hydroxylase katalysiert werden. Diesen Reaktionsschritt bearbeitet Katja Federolf. Ziel dieser Untersuchungen ist es, die an der Podophyl-

lotoxinbiosynthese beteiligten Gene in den Zellkulturen zu überexprimieren und dadurch die Produktausbeuten weiter zu steigern.⁷

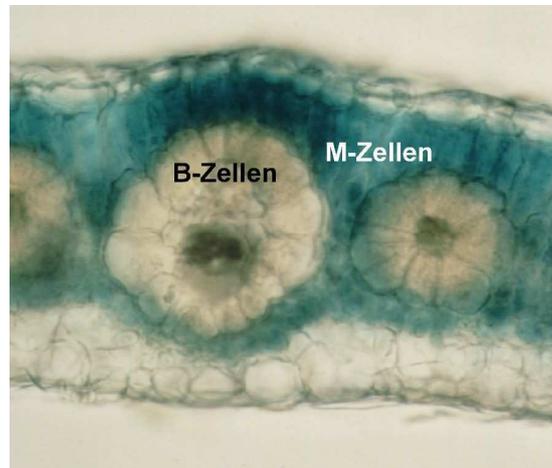


Abb. 5: Querschnitt durch das Blatt einer transgenen C₄-Pflanze (*Flaveria bidentis*).

Die Steuerregion (Promotor) des Gens für die C₄-PEP-Carboxylase bewirkt eine mesophyll-spezifische (M-Zellen) Expression eines Farbgens, was zu einer blauen Anfärbung der entsprechenden Zellen führt. Das Farbgen ist nicht in den Bündelscheidenzellen (B-Zellen) des Blattes aktiv.

C₄-Pflanzen wie die verschiedenen Hirsen, das Zuckerrohr (*Saccharum officinarum*) und der Mais (*Zea mays*) in seiner Urform (Teosinte) sind typische Vertreter der Flora heißer und trockener Standorte. Diese Pflanzen zeichnen sich gegenüber unseren „normalen“ C₃-Pflanzen durch eine sehr effiziente Art der Photosynthese aus. Sie können hohe Lichtstärken ausnützen und gleichzeitig sparsam mit Wasser umgehen. Damit sind sie hervorragend an ihre Standorte angepasst. Die Photosynthese der C₄-Pflanzen ist deshalb so effizient, weil sie arbeitsteilig organisiert ist: Nicht jede Blattzelle beherrscht das gesamte Repertoire der Photosynthese, sondern die einzelnen Module sind komplementär auf zwei unterschiedliche Zelltypen, die so genannten Mesophyll- bzw. Bündelscheidenzellen, aufgeteilt (Abb. 5). C₄-Pflanzen trifft man in vielen, nicht näher miteinander verwandten Gruppen der Blütenpflanzen an. Sie sind also mehrmals unabhängig voneinander aus C₃-Vorläuferpflanzen hervorgegangen. Diese mehrfache und parallele Entstehung der C₄-Photosynthese legt nahe, dass nur relativ wenige genetische Veränderungen erforderlich waren, um eine C₃- in eine C₄-Pflanze umzuwandeln. Dem entspricht, dass alle Enzyme der Photosynthese keine Neuerfindungen sind, sondern in anderer Form im Stoffwechsel der C₃-Pflanzen bereits vorkommen.

Gemeinsam mit Peter Westhoff beschäftigen sich die Graduierten Meryem Akyildiz, Sascha Engelmann und Udo Gowik mit dem Eingangsenzym der C₄-Photosynthese, der Phosphoenolpyruvat-Carboxylase. Sie wollen herausfinden, welche Veränderungen dieses Enzym und sein zugehöriges Gen im Verlaufe der Evolution erfahren haben, um der neuen Aufgabe gerecht zu werden.⁸ Zur Lösung dieser Fragestellung haben sich die Wissenschaftler des Instituts für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Pflanzen die Pflan-

⁷ Vgl. Fuss (demnächst) und Molog *et al.* (2001).

⁸ Vgl. Svensson *et al.* (2003) und Bläsing *et al.* (2000).

zengattung *Flaveria* ausgesucht, die in ihrem Formenkreis nicht nur C₃- und C₄-Arten, sondern auch ein reichhaltiges Spektrum von Pflanzen mit intermediärer Photosynthese enthält. Offensichtlich ist die Evolution in dieser Gattung in Richtung C₄-Photosynthese noch nicht abgeschlossen. *Flaveria* stellt daher ein ausgezeichnetes System für diese evolutionsbiologischen Studien dar.

Udo Gowik hat in seiner Doktorarbeit untersucht, welche Schaltersequenzen in der Steuerregion des Phosphoenolpyruvat-Carboxylase-Gens dafür verantwortlich sind, dass dieses Gen ausschließlich in den Mesophyllzellen des Blattes abgelesen wird. Er konnte zeigen, dass nur vier Basenpaare im Gen der Phosphoenolpyruvat-Carboxylase dafür verändert werden müssen. Und genau sie fehlen in der Steuerregion des Phosphoenolpyruvat-Carboxylase-Gens der C₃-Pflanze. Wenige Mutationen reichen also aus, um die Ablesespezifität eines Gens drastisch zu verändern. Meryem Akyildiz und Sascha Engelmann wollen nun herausfinden, wie dieser Unterschied von nur vier Nukleotiden von der Ablesemaschinerie überhaupt erkannt wird.

Molekulare Mechanismen der Energieumwandlungen

Die Bereitstellung von Energie ist eine grundlegende Funktion des Stoffwechsels aller Organismen. Als Energiequellen können reduzierte anorganische Verbindungen, das Licht der Sonne oder nieder- bzw. hochmolekulare, reduzierte organische Verbindungen dienen. Gleichgültig, ob die Organismen autotroph oder heterotroph sind, sie alle wandeln die aufgenommene Energie in die Energie des Adenosintriphosphats (ATP) um. In diesem Graduiertenkolleg stehen die sauerstoffunabhängige (anaerobe) Energiegewinnung, die sauerstoffabhängige (aerobe) Energiegewinnung, die so genannte Atmungskettenphosphorylierung sowie die chemolithoheterotrophe Energiegewinnung aus Schwefelwasserstoff im Mittelpunkt des Interesses mehrerer Arbeitsgruppen.

Eine der einfachsten Formen der Energieumwandlung erfolgt in der Glykolyse, die in allen Organismen vorkommt. In diesem Stoffwechselweg wird die Energie, die bei der Oxidation von Traubenzucker gewonnen wird, transient über ein Acyl- bzw. ein Enolphosphat gespeichert und in je einer anschließenden Reaktion zur ATP-Bildung abgerufen. Diese äußerst ineffiziente Energiegewinnung genügt nur, um kurzfristig und schnell ATP, z. B. in keimenden Pflanzen oder während einer Kampf- und Fluchtreaktion von Tieren, bereitzustellen. Der Grund dafür liegt in der gleichzeitigen Akkumulation der Endprodukte dieser Gärungen in Form reduzierter organischer Verbindungen, zu denen das Ethanol der Hefe, die verschiedenen Opine bei vielen wirbellosen Tieren und Laktat, das Salz der Milchsäure bei Insekten, Krebstieren und Wirbeltieren, gehören. Außerdem ist dieser so genannte fermentative Stoffwechsel immer mit einer Protonenproduktion verbunden, die zu einer funktionsbeeinträchtigenden Ansäuerung der Gewebe führt.

Trotzdem überleben viele Tiere in ihrer ökologischen Nische für längere Zeit ohne Sauerstoff. Zu ihnen gehören vor allem die Magen-Darm-Parasiten. Aber auch in anderen Lebensräumen sind Tiere gelegentlichem oder andauerndem Sauerstoffmangel ausgesetzt. Solche Biotop sind z. B. eisbedeckte Teiche und Tümpel oder die Gezeitenzonen der Meere. Tiere, die in letzterem Biotop entweder im Sediment oder an der Oberfläche exponiert leben, müssen sich bei Ebbe tief in das Sediment eingraben bzw. ihre Schalen hermetisch schließen, um der Austrocknung oder dem Fraßdruck der Feinde vorzubeugen. Sie können jedoch dann als wasseratmende Tiere bei Niedrigwasser keinen Sauerstoff

mehr aus der Luft aufnehmen. In dieser Zeit gewinnen z. B. der Wattwurm (*Arenicola marina*), die Miesmuschel (*Mytilus edulis*) oder die Auster (*Ostrea edulis*) anfänglich ihre Energie aus der Glykolyse, wobei sie die Endprodukte (Opine und Laktat) akkumulieren. Wenn der Sauerstoffmangel länger andauert, wird in einer verkürzten Atmungskette in den Mitochondrien ATP gewonnen, wobei Succinat, Acetat und Propionat als weitere Endprodukte der Energieumwandlung akkumulieren bzw. ausgeschieden werden.⁹ Aufgrund dieser Fähigkeit können die Tiere längere Zeit auf dem Trockenen überleben und sind deshalb auch leicht über weite Strecken zu den Fischgeschäften des Binnenlandes zu verschicken. Die Evolution der Vielfalt der Opine und die ihre Synthese katalysierenden Opindehydrogenasen sowie der unter längerfristigem Sauerstoffmangel ablaufende Energiestoffwechsel bei marinen wirbellosen Tieren werden von Ulrike Hergert, Frank Janssen und Andre Müller in der Arbeitsgruppe von Manfred Grieshaber untersucht.

Einige der in der Gezeitenzone der Meere lebenden Tiere, insbesondere solche, die sich in das Sediment eingraben, müssen sich nicht nur an einen temporären Sauerstoffmangel, sondern auch an Schwefelwasserstoff (H_2S) anpassen, dessen Gestank nach faulen Eiern jeder Wattwanderer sicher schon gerochen hat. Schwefelwasserstoff ist für alle Lebewesen sehr toxisch. Trotzdem können mehrere Tierarten H_2S tolerieren und teilweise dessen Energiegehalt verwenden. Gemeinsam mit Susanne Völkel, Stephanie Wohlgemuth und weiteren Mitarbeiterinnen konnte Manfred Grieshaber nachweisen, dass der Wattwurm Schwefelwasserstoff in den Mitochondrien zu Thiosulfat oxidiert und damit gleichzeitig entgiftet.¹⁰ Die gebildeten Elektronen werden über den Ubichinonpool in die Atmungskette der Mitochondrien eingeschleust und die frei werdende Energie wird zu ATP umgewandelt. Tiere, die diesen Mechanismus besitzen, können also Energie in einem chemolithoheterotrophen Stoffwechsel gewinnen.¹¹

Vermutlich wird die Oxidation von Schwefelwasserstoff zu Thiosulfat durch ein membranständiges, mitochondriales Enzym, die Sulfid-Chinon-Oxidoreduktase (SQR), katalysiert (Abb. 6). Die Aktivität des Enzyms wurde bislang an intakten Würmern, isoliertem Hautmuskelschlauchgewebe und isolierten Mitochondrien von *Arenicola marina* nachgewiesen. Eine Reinigung des Enzyms ist bislang jedoch nicht gelungen. Auch die Gensequenz der SQR von *A. marina* ist unbekannt. Detaillierte biochemische Untersuchungen an Prokaryoten beschreiben jedoch die Eigenschaften der SQR aus dem α -Proteobakterium *Rhodobacter capsulatus*, dem Cyanobakterium *Oscillatoria limnetica* und aus dem grünen Schwefelbakterium *Chlorobium limicola*. Aus einer Reihe weiterer Organismen sind Gensequenzen beschrieben, die auf die Anwesenheit schwefelwasserstoffoxidierender Enzyme hinweisen.¹²

Überraschenderweise kommt die SQR unter den Eukaryoten viel häufiger vor, als bisher vermutet wurde. Vielleicht handelt es sich bei diesem Enzym um ein Relikt aus einer Zeit, in der Schwefelwasserstoff vor allem im Meerwasser weit verbreitet war. Neuere geochemische Untersuchungen belegen tatsächlich hohe Sulfidkonzentrationen im Tiefseewasser während der Zeit zwischen 1 bis 2 Milliarden Jahren vor der Gegenwart. In jener Epoche der Erdgeschichte war die biologische Sulfatreduktion bzw. die anaerobe Methanoxidi-

⁹ Vgl. Grieshaber *et al.* (1994).

¹⁰ Vgl. Grieshaber und Völkel (1998).

¹¹ Vgl. Doeller *et al.* (2001).

¹² Vgl. Griesbeck *et al.* (2000).

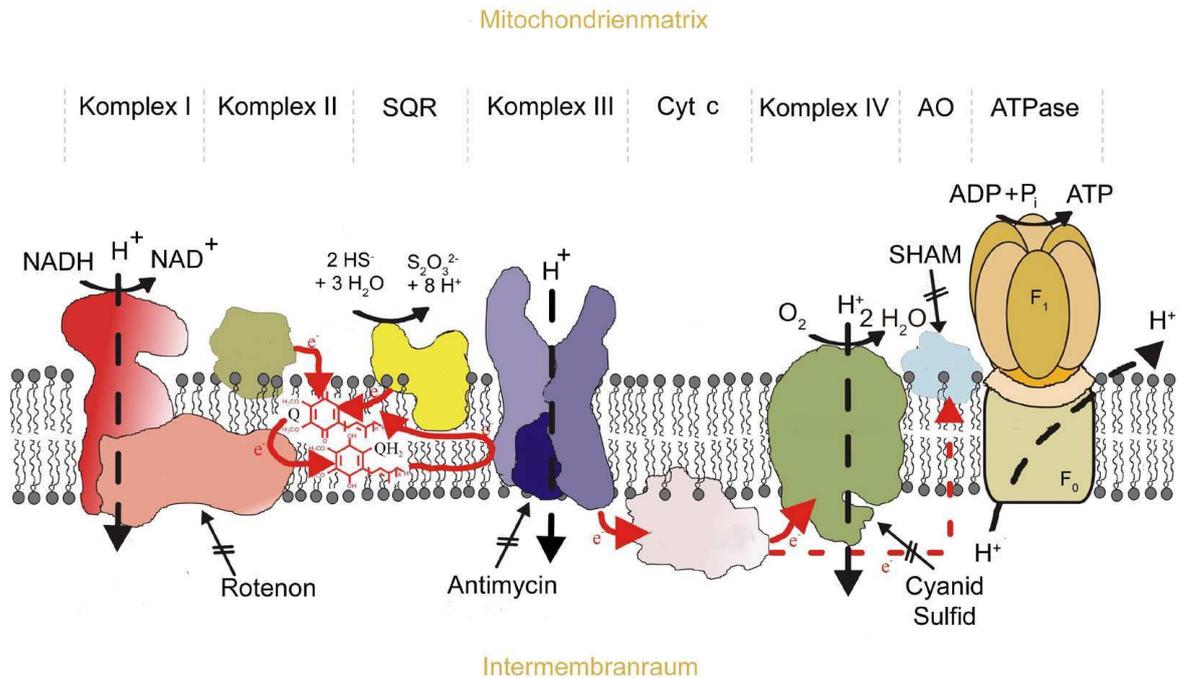


Abb. 6: Schematische Darstellung der mitochondrialen Komplexe der Atmungskette und der Sulfid-Quinone-Oxidoreduktase. Der wahrscheinliche Elektronenfluss, der aus der Oxidation von Schwefelwasserstoff zu Thiosulfat resultiert, ist mit roten Pfeilen dargestellt.

on bei gleichzeitiger Reduktion von Sulfat zu Schwefelwasserstoff global verbreitet.¹³ Als Folge waren mit Ausnahme ihres Oberflächenwassers die Meere hypoxisch und im hohen Maße sulfidisch. Da der Ursprung und die frühe Diversifizierung der Eukaryoten in genau jener Zeit stattfand, müssen die Eukaryoten von Anfang an und bis in relativ späte Phasen ihrer Evolution beträchtlichen Sulfidkonzentrationen gewachsen gewesen sein. Somit ist die SQR, wahrscheinlich auch das Enzym von *A. marina*, ein biochemisches Relikt aus der frühen hypoxischen und sulfidischen Phase der Eukaryotenevolution.¹⁴

Ursula Theissen versucht mit ihrem Doktorvater William Martin, das für die SQR von *A. marina* kodierende Gen zu isolieren. Anschließend möchte sie es in SQR-Mutanten von *S. pombe* heterolog exprimieren, um so das Enzym von *A. marina* funktionell charakterisieren zu können. Zu diesem Zweck soll die Sequenzkonservierung in eukaryotischen SQR-Genen gezielt genutzt werden, um heterologe Sonden für die Isolierung der SQR aus *A. marina* zu gewinnen. Des Weiteren soll in biochemischen und molekularen Arbeiten untersucht werden, ob der fakultativ anaerobe Einzeller *Euglena gracilis* ebenfalls das SQR-Gen besitzt. Bei erfolgreichem Ausgang sollen die geplanten Arbeiten sowohl Einblicke in die Biochemie der Energiegewinnung von Eukaryoten aus rezenten hypoxischen Habitaten als auch in die anaerobe Vergangenheit der eukaryotischen Abstammungsgemeinschaft gewähren.

Mit der Anreicherung von photosynthetisch gebildetem Sauerstoff in der Atmosphäre nutzen viele Organismen die hohe Energieausbeute, die bei der sauerstoffabhängigen Oxidation ihrer Nahrung gewonnen werden kann. Das System der oxidativen Phosphorylie-

¹³ Vgl. Boetius *et al.* (2000).

¹⁴ Vgl. Tielens *et al.* (2002), Martin und Russell (2003) und Theissen *et al.* (2003).

rung, das in den Mitochondrien der Zellen lokalisiert ist, katalysiert über hochkomplizierte Enzymkomplexe die Synthese von ATP, das unter Ausnutzung einer transmembranen, elektrochemischen Potentialdifferenz von Protonen über einen mechanischen Energiewandlungsschritt gebildet wird (Abb. 7).

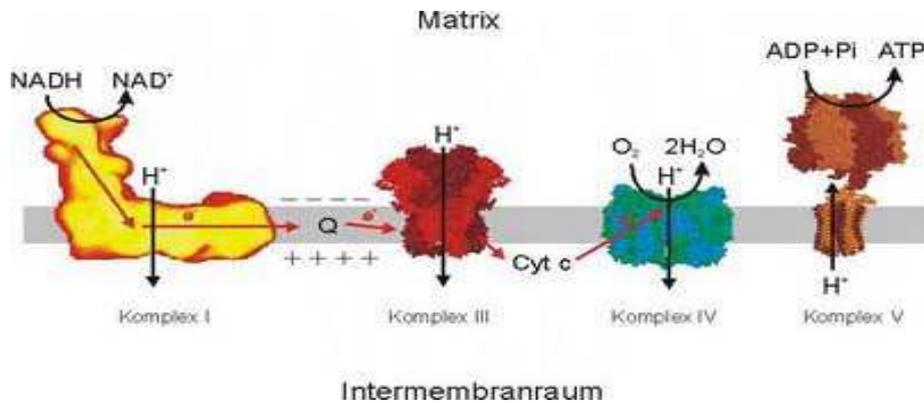


Abb. 7: Die wichtigsten Enzymkomplexe des mitochondrialen Systems der oxidativen Phosphorylierung. Die drei Atmungsketten-Komplexe I, III und IV verbinden den energetisch bergab gerichteten Transport von Elektronen (e^-) von NADH auf Sauerstoff (O_2) unter Bildung von Wasser (H_2O) mit der Verschiebung von Protonen (H^+) von der negativ zur positiv geladenen Seite der Membran. Die Atmungskettenkomplexe sind damit Erzeuger eines transmembranen Protonenpotentials. Der ATPase-Komplex V ist der hauptsächliche Verbraucher dieses Potentials, indem er mit Hilfe der Energie der rückströmenden Protonen über proteinmechanische Prozesse ATP synthetisiert. Während von den Komplexen III, IV und V hoch aufgelöste Strukturen bekannt sind und die Arbeitsweise der Komplexe heute auf atomarer Ebene beschreibbar ist, gibt es zu Komplex I noch keine molekularen Strukturdaten. Der Grund dafür liegt in der enormen Größe (eine Million Dalton) und in dem komplexen Aufbau (mehr als 40 Proteinuntereinheiten mit mehr als acht verschiedenen prosthetischen Gruppen) dieses Enzymkomplexes.

Hanns Weiss und seine Stipendiatinnen und Stipendiaten Anke Abelmann, Thorsten Borgs, Benedikt Brors, Lars Kintscher und Vassiliki Tsalastra untersuchen den Komplex I der mitochondrialen Atmungskette. Dass der erste Komplex als einziger noch nicht kristallisiert und auf atomarer Ebene beschrieben ist, liegt in seiner hohen Molmasse von annähernd einer Million Dalton und seinem äußerst komplexen Aufbau aus mehr als 40 verschiedenen Proteinuntereinheiten, an denen wenigstens acht verschiedene prosthetische Gruppen gebunden sind. Die Untereinheiten sind in Form von zwei elektronenmikroskopisch unterscheidbaren Teilen organisiert, die wegen ihrer L-förmigen Anordnung peripherer Arm und Membranarm genannt werden. Durch Genausschaltung wurden Mutanten des Pilzes *Neurospora crassa* gewonnen, die entweder nur den peripheren oder nur den Membranarm bilden können. Beide Arme konnten so getrennt isoliert werden. Es gelang, Kristalle des Membranarms zu züchten, und in Zusammenarbeit mit dem Institut für Biologische Strukturformforschung am Forschungszentrum Jülich wurde mit der Röntgenstrukturanalyse begonnen.¹⁵

Die ATP-Synthasen der mitochondrialen und bakteriellen oxidativen Phosphorylierung sowie der pflanzlichen photosynthetischen Phosphorylierung sind die eigentlichen Ener-

¹⁵ Vgl. Schulte *et al.* (1999), Friedrich *et al.* (2000) und Rasmussen *et al.* (2001).

giewandler. Sie nutzen die transmembrane elektrochemische Potentialdifferenz von Protonen, die beim respiratorischen bzw. photosynthetischen Elektronentransport aufgebaut wird, und treiben damit die endergone Synthese von ATP aus ADP und Phosphat. Viele Resultate deuten darauf hin, dass die Transformation einen mechanischen Energieumwandelungsschritt beinhaltet. Die ATP-Synthasen bestehen aus einem membrandurchspannenden Teil F_0 und dem katalytischen Teil F_1 . F_0 ist aus mindestens drei verschiedenen Untereinheiten, F_1 aus fünf verschiedenen Untereinheiten mit der Zusammensetzung $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$ aufgebaut. Die 3D-Strukturen des mitochondrialen, bakteriellen und plastidären F_1 wurden atomar aufgelöst, die Struktur des F_0 -Bereiches ist dagegen noch unzureichend aufgeklärt (Abb. 636).

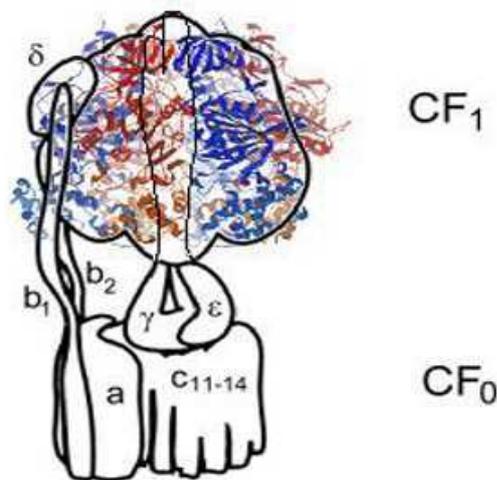


Abb. 8: Strukturmodell der Chloroplasten-ATP-Synthase. Der farbig dargestellte CF_1 -Teil wurde durch Röntgenkristallographie von Georg Groth (Institut für Biochemie der Pflanzen der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) aufgelöst.¹⁷ Die drei α -Untereinheiten sind blau, die drei β -Untereinheiten rot gezeichnet. Die zentrale Struktur, bestehend aus den Untereinheiten γ , ε und dem Zylinder aus elf bis 14 c -Untereinheiten, sollen den Rotor ausmachen.

Die drei α -Untereinheiten und die drei β -Untereinheiten, auf denen sich die drei katalytischen Zentren befinden, sind zu einem hexagonalen Ring zusammengeschlossen. Im Zentrum befindet sich, einer Achse gleich, die Untereinheit γ . Am isolierten F_1 konnte gezeigt werden, dass die Hydrolyse von ATP eine Rotation der γ -Untereinheit in dem $\alpha_3\beta_3$ -Hexagon bewirkt. Umgekehrt wird angenommen, dass die Rotation von γ die Bildung von ATP bewirkt. Der antreibende Motor soll aus stationären („Stator“) und rotierenden Teilen („Rotor“) von F_0 bestehen (Abb. 636). Der Rotor soll durch den Fluss von Protonen entlang der Potentialdifferenz angetrieben werden.¹⁸

Die im Graduiertenkolleg von Heinrich Strotmann und der Stipendiatin Korolina Zientek sowie den Stipendiaten Marco Rost und Markus Berns durchgeführten Forschungsarbeiten befassen sich mit strukturellen und mechanistischen Fragen, die die oben dargestellte Hypothese kritisch beleuchten sollen. Zum einen wird untersucht, welche Proteindomänen die Verbindung zwischen den Teilkomplexen F_0 und F_1 herstellen und welcher

¹⁷ Vgl. Groth und Pohl (2001).

¹⁸ Vgl. Junge *et al.* (1997).

Art die Wechselwirkungen sind. Zum anderen wird versucht, durch gezielte Mutagenese Strukturelemente zu identifizieren, die sensibel für Bewegungsvorgänge im Zusammenhang mit der Energieübertragung sein können. So bewirkt beispielsweise eine Verbiegung der axialen γ -Untereinheit eine starke Einschränkung der Funktion, oder in den β -Untereinheiten im Bereich der katalytischen Stellen der Austausch eines einzigen Glycins, das offenbar als Scharnier fungiert, gegen ein Alanin den Verlust der energetischen Koppelung.¹⁹

Obwohl nach gängiger Lehrbuchmeinung Fettsäuren bei Pilzen und Tieren im Cytosol und bei Pflanzen in Plastiden synthetisiert werden, entdeckten vor einigen Jahren Hanns Weiss und seine Graduierten Benedikt Brors, Verena Haupt und Angela Schlitt gemeinsam mit anderen Arbeitsgruppen, dass Mitochondrien von Tieren, Pilzen und Pflanzen auch eine eigenständige Fettsäuresynthese besitzen. Folglich ist dieses Zellorganell nicht nur für die Energiegewinnung zuständig. Eine weitere wichtige Funktion der Mitochondrien und der in ihnen lokalisierten Fettsäuresynthese ist auch die Bereitstellung von Liponsäure. Ausgangspunkt für die Aufklärung dieses mitochondrialen Synthesewegs war der Nachweis eines mitochondrialen Acylcarrierproteins, das einerseits an der Synthese von Liponsäure beteiligt ist und andererseits als Untereinheit des Komplex I der Atmungsketten fungiert. Durch Analyse der Genomsequenz des Hyphenpilzes *Neurospora crassa* und mittels gentechnischer Methoden wurden weitere Enzyme der mitochondrialen Fettsäuresynthese identifiziert. Ungeklärt ist nach wie vor, in welcher Beziehung die beiden Funktionen des Acylcarrierproteins in der Fettsäuresynthese und der Atmungskette stehen. Während in Tieren und Pflanzen mehrere mitochondriale Acylcarrierproteine vorkommen, wurde in Pilzen bisher nur je eines identifiziert.²⁰

Während die Biologen des Graduiertenkollegs die in der belebten Natur vorkommenden Mechanismen der Stoff- und Energieumwandlung untersuchen, versuchen die Kollegen des Faches Chemie, Verbindungen zu synthetisieren, die modellartig die Struktur und den Reaktionsmechanismus von aktiven Zentren von Enzymen darstellen.

Das Ziel von Günter Wulff und seinen Stipendiaten Andrea Biffis, Dirk Kaspar, Michael Grün, Marco Emgenbroich, Byong-Oh Chong und Karsten Knorr ist der Aufbau von Analogon des aktiven Zentrums von Antikörpern und Enzymen mit Hilfe des molekularen Prägens. Hiermit sollten sich synthetische Katalysatoren herstellen lassen, die ähnlich günstige Eigenschaften wie natürliche Enzyme besitzen, darüber hinaus aber deutlich stabiler und besser zugänglich sind. Dazu wird in Gegenwart eines geeigneten Matrizenmoleküls (einer Schablone) und polymerisierbarer funktioneller Gruppen eine vernetzende Polymerisation durchgeführt. Nach Entfernen der Matrize hinterbleibt im Polymer ein Abdruck von spezifischer Gestalt und mit funktionellen Gruppen in definierter Anordnung. Polymere dieser Art können nicht nur als Enzymmodelle benutzt werden, sondern auch als selektive Adsorbentien, Chemosensoren oder künstliche Antikörper.²¹ Enzymmodelle können durch Prägen mit stabilen Übergangszustandsanalogon einer Reaktion erhalten werden, wenn geeignete Haft- und Katalysegruppen eingebracht werden.²² Solche Katalysatoren besitzen eine bemerkenswerte Aktivität und Selektivität. So konnten Katalysatoren

¹⁹ Vgl. Rost (2001) und Berns (2000).

²⁰ Vgl. Schulte und Weiss (1999), Schulte (2001) und Schulte *et al.* (2002).

²¹ Vgl. Wulff (1995).

²² Vgl. Wulff (2002).

erhalten werden, die einen optischen Antipoden ganz bevorzugt umsetzen. Sie zeigen also, wie z. B. die Lipase A, Enantioselektivität. Auch konnten Mikrogele hergestellt werden, die löslich sind und ähnliche Dimensionen wie natürliche Enzyme besitzen.

Zink spielt in der Biochemie eine herausragende Rolle. Man kennt über 300 zinkhaltige Enzyme, von denen die meisten zur Klasse der Hydrolasen gehören. Es kann sowohl Tertiär- und/oder Quartärstrukturen stabilisieren als auch aktiv an katalytischen Prozessen teilnehmen. So katalysieren Zinkenzyme der Carboanhydrase-Familie die reversible Hydratation von CO_2 . Das aktive Zentrum besteht aus einem Zinkion, das tetraedrisch von drei Histidinen (Abb. 9) und einem Wasser- oder Hydroxid-Liganden koordiniert ist.

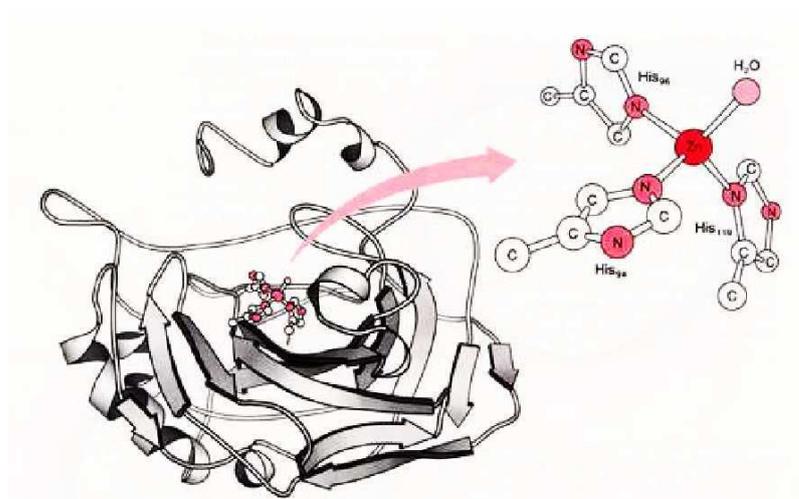


Abb. 9: Struktur der Carboanhydrase und die atomare Darstellung des aktiven Zentrums des Enzyms. Das Zinkion ist tetraedrisch von drei Histidinen und einem Wasser- oder Hydroxid-Liganden koordiniert.

Wolfgang Kläui und die Kollegiaten Peter Kunz und Martin Berghahn versuchen, Modellverbindungen zu synthetisieren, die eben diese Umgebung um das zentrale Zink nachahmen. Zu den erfolgreichsten Liganden gehören die von ihnen erstmals synthetisierten Tris(pyrazolyl)methansulfonate, eine Klasse von neuen Liganden, die den vielverwendeten Tris(pyrazolyl)boraten nachempfunden sind, aber im Gegensatz zu jenen in wässrigen Lösungsmitteln löslich sind. Sie zeigen eine flexible Koordinationschemie und bilden Strukturen, wie sie in dinuklearen Zinkenzymen (z. B. Phospholipase C) vorkommen.²³ Des Weiteren konzentrieren sie sich auf funktionale Modellverbindungen von Zinkenzymen. So ist es gelungen, Zinkkomplexe von Liganden der neuen Tris[2-isopropylimidazol-(4)5-yl]phosphan-Klasse zu synthetisieren, die die Hydrolyse aktivierter Ester in wässrigen Lösungsmitteln katalysieren.²⁴

²³ Vgl. Kläui *et al.* (im Druck).

²⁴ Vgl. Kunz *et al.* (demnächst).

Bibliographie

- BERNS, M. *Mutagenese konservierter Domänen der β -Untereinheit der Escherichia coli F_0F_1 -ATPase*. Dissertation. Düsseldorf 2000.
- BLÄSING, O. E., P. WESTHOFF und P. SVENSSON. „Evolution of C_4 -phosphoenolpyruvate carboxylase in Flaveria, a conserved serine residue in the carboxyl-terminal part of the enzyme is a major determinant for C_4 -specific characteristics“, *Journal of Biological Chemistry* 275 (2000), 27917-27923.
- BOETIUS, A., K. RAVENSCHLAG, C. J. SCHUBER, D. RICKERT, F. WIDDEL, A. GLESEKE, R. AMANN, B. B. JORGENSEN, U. WITTE und O. PFANNKUCHE. „A marine consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane“, *Nature* 407 (2000), 623-626.
- DOELLER, J. E., M. K. GRIESHABER und D. W. KRAUS. „Chemolithoheterotrophy in a metazoan tissue: thiosulfate production matches ATP demand in ciliated mussel gills“, *Journal of experimental Biology* 204 (2001), 3755-3764.
- FRIEDRICH, T., B. BRORS, P. HELLWIG, L. KINTSCHER, T. RASMUSSEN, D. SCHEIDE, U. SCHULTE, W. MÄNTELE und H. WEISS. „Characterisation of two novel redox groups in the respiratory NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I)“, *Biochimica et Biophysica Acta* 1459 (2000), 305-309.
- FUNKE, S. A., A. EIPPER, M. T. REETZ, N. OTTE, W. THIEL, G. VAN POUDEROYEN, B. W. DIJKSTRA, K.-E. JAEGER und T. EGGERT. „Directed evolution of an enantioselective *Bacillus subtilis* lipase“, *Biocatalysis and Biotransformation* 21 (2003), 67-73.
- FUSS, E. „Lignans in plant cell and organ cultures: An overview“, *Phytochemistry Reviews* (demnächst).
- GERHARZ, T., S. REINELT, S. KASPAR, L. SCAPOZZA und M. BOTT. „Identification of basic amino acid residues important for citrate binding by the periplasmic receptor domain of the sensor kinase CitA“, *Biochemistry* 42 (2003), 5917-5924.
- GRIESBECK, Ch., G. HAUSKA und M. SCHÜTZ. „Biological sulfide oxidation: Sulfide-quinone reductase (SQR), the primary reaction“, *Recent Research Developments in Microbiology* 4 (2000), 179-203.
- GRIESHABER, M. K., I. HARDEWIG, U. KREUTZER und H.-O. PÖRTNER. „Physiological and biochemical adaptations to hypoxia in invertebrates“, *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* 125 (1994), 43-148.
- GRIESHABER, M. K. und S. VÖLKEL. „Animal adaptations for tolerance and exploitation of poisonous sulfide“, *Annual Reviews of Physiology* 60 (1998), 33-53.
- GROTH, G. und E. POHL. „Protein Structure and Folding - The structure of the chloroplast F_1 -ATPase at 3.2 Å resolution“, *Journal of Biological Chemistry* 276 (2001), 1345-1352.
- ISHIGE, T., M. KRAUSE, M. BOTT, V. F. WENDISCH und H. SAHM. „The phosphate starvation stimulon of *Corynebacterium glutamicum* as determined by DNA microarray analyses“, *Journal of Bacteriology* 85 (2003), 4519-4529.
- JAEGER, K.-E., T. EGGERT, A. EIPPER und M. T. REETZ. „Directed evolution and the creation of enantioselective biocatalysts“, *Applied Microbiology and Biotechnology* 55 (2001), 519-530.
- JUNGE, W., H. LILL und W. ENGELBRECHT. „ATP synthase: an electrochemical transducer with rotary mechanics“, *Trends in Biochemical Sciences* 22 (1997), 420-423.

- KENNERKNECHT, N., H. SAHM, M. R. YEN, M. PATEK, M. H. SAIER JR. und L. EGGELING. „Export of L-isoleucine from *Corynebacterium glutamicum*: a two-gene-encoded member of a new translocator family“, *Journal of Bacteriology* 184 (2002), 3947-3956.
- KLÄUI, W., M. BERGHAIN, W. FRANK, G. J. REISS, T. SCHÖNHERR, G. RHEINWALD und H. LANG. „Tris(pyrazolyl)methanesulfonates, more than just analogues of tris(pyrazolyl)borate ligands: N,N,N-, N,N,O- and other coordination modes“, *European Journal of Inorganic Chemistry* 11 (2003), 2059-2070.
- KUNZ, P. C., G. J. REISS, W. FRANK und W. KLÄUI. „A novel water soluble tripodal imidazolyl ligand as model for the tris histidine motif of zinc enzymes: Nickel, cobalt and zinc complexes and a comparison to metal binding in carbonic anhydrase“, *European Journal of Inorganic Chemistry* (demnächst).
- MARTIN, W. und M. RUSSELL. „On the origins of cells: a hypothesis for the evolutionary transitions from abiotic geochemistry to chemoautotrophic prokaryotes, and from prokaryotes to nucleated cells“, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 358 (2003), 59-85.
- MOLOG, A. G., U. EMPT, S. KUHLMANN, W. VAN UDEN, N. PRAS, A.-W. ALFERMANN und M. PETERSEN. „Deoxypodophyllotoxin 6-hydroxylase, a cytochrome P450 monooxygenase from cell cultures of *Linum flavum* involved in the biosynthesis of cytotoxic lignans“, *Planta* 214 (2001), 288-294.
- PETERSEN S., A. A. DE GRAAF, L. EGGELING, M. MÖLLNEY, W. WIECHERT und H. SAHM. „In vivo quantification of parallel and bidirectional fluxes in the anaplerosis of *Corynebacterium glutamicum*“, *Journal of Biological Chemistry* 275 (2000), 35932-35941.
- RASMUSSEN, T., D. SCHEIDE, B. BRORS, L. KINTSCHER, H. WEISS und T. FRIEDRICH. „Identification of two tetranuclear FeS clusters on the ferredoxin-type subunit of NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I)“, *Biochemistry* 40 (2001), 6124-6131.
- ROST, M. *Untersuchungen über die Rolle der Untereinheit γ im Mechanismus der Energietransduktion in der Escherichia coli ATP-Synthase*. Dissertation. Düsseldorf 2001.
- SCHULTE, U. und H. WEISS. „Structure, function and biogenesis of respiratory NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I)“, in: S. PAPA, F. GUERRIERI und J. M. TAGER (Hrsg.). *Frontiers of cellular bioenergetics. Molecular Biology, Biochemistry and Physiopathology*. London 1999.
- SCHULTE, U., V. HAUPT, A. ABELMANN, W. FECKE, B. BRORS, T. RASMUSSEN, T. FRIEDRICH und H. WEISS. „A reductase/isomerase subunit of mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) carries an NADPH and is involved in the biogenesis of the complex“, *Journal of Molecular Biology* 292 (1999), 569-580.
- SCHULTE, U. „Biogenesis of respiratory complex I.“, *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 33 (2001), 205-212.
- SCHULTE, U., I. BECKER, H. W. MEWES und G. MANNHAUPT. „Large scale analysis of sequences from *Neurospora crassa*“, *Journal of Biotechnology* 94 (2002), 3-13.
- SVENSSON, P., O. E. BLÄSING und P. WESTHOFF. „Evolution of C₄-phosphoenolpyruvate carboxylase“, *Archive of Biochemistry and Biophysics* 414 (2003), 180-188.
- THEISSEN, U., M. HOFFMEISTER, M. K. GRIESHABER und W. MARTIN. „Single eubacterial origin of eukaryotic sulfide:quinone oxidoreductase, a mitochondrial enzyme conserved from the early evolution of eukaryotes during anoxic and sulfidic times“, *Molecular Biology and Evolution* 20 (2003), 1564-1574.

- TIELENS, A. G. M., C. ROTTE, J. VAN HELLEMOND und W. MARTIN. „Mitochondria as we don't know them“, *Trends in Biochemical Sciences* 27 (2002), 564-572.
- WULFF, G. „Enzyme-like catalysis by molecularly imprinted polymers“, *Chemistry Reviews* 102 (2002), 1-27.
- WULFF, G. „Molekulares Prägen (Imprinting) in vernetzten Materialien mit Hilfe von Matrizenmolekülen – auf dem Weg zu künstlichen Antikörpern“, *Angewandte Chemie* 107 (1995), 1958; „Molecular imprinting in cross-linked materials with the aid of molecular templates – A way towards artificial antibodies“, *Angewandte Chemie International Edition* 34 (1995), 1812-1832.