

Jahresbericht 2014
Annual Report 2014

caesar

 center of advanced
european studies
and research



Stiftung caesar -
assoziiert mit der
Max-Planck-Gesellschaft

 years of
caesar



Stiftung caesar -
assoziiert mit der
Max-Planck-Gesellschaft

caesar



center of advanced
european studies
and research

Jahresbericht 2014

Annual Report 2014

Inhaltsverzeichnis

Vorwort	9
Gründung der neuen Graduiertenschule, der "International Max Planck Research School" (IMPRS) Gehirn und Verhalten	15
Forschungsberichte	
Abteilung Organisation des Gehirns und Verhaltens: Überblick	21
Was sehen sie? - Technische Entwicklungen zur Erforschung der visuellen Wahrnehmung bei sich frei bewegenden Säugetieren	23
Bewegung der Augen bei Ratten reduziert blinde Flecken im Gesichtsfeld oberhalb des Kopfes <i>David Greenberg, Jürgen Sawinski, Damian Wallace, Jason Kerr</i>	27
Okulomotorische Steuerung bei verschiedenen Säugetieren <i>Damian Wallace, Jürgen Sawinski, David Greenberg, Rebekah Corlew, David Fitzpatrick, Jason Kerr</i>	31
Bildgebung von Neuronenpopulationen: Dem Gehirn bei der Arbeit zusehen	35
Wie Aktionspotenziale aus optischen Daten präzise detektiert werden können <i>David Greenberg, Damian Wallace, Jason Kerr</i>	37
Trennung von sich überlappenden Fluoreszenzsignalen <i>Kay Voit, Damian Wallace, Jason Kerr, David Greenberg</i>	41
Zugang zu tiefer liegenden Hirnstrukturen mittels Licht <i>Alexandr Klioutchnikov, Jürgen Sawinski, Jason Kerr</i>	45
Konservierungsstoffe, Pestizide, UV-Blocker und Co.: Wie Alltagschemikalien die Spermienfunktion beeinträchtigen <i>Christian Schiffer, Astrid Müller, Timo Strünker</i>	51
Der Schlüssel zum Herzen – Creld1 <i>Dagmar Wachten</i>	63



Wozu strukturelle Dynamik von Proteinen? – Auf der Suche nach neuen Medikamenten <i>Elmar Behrmann</i>	71
Jedes Elektron zählt: Die Herausforderungen der Kryo-Elektronenmikroskopie <i>Stephan Irsen</i>	77
Berichte über abgeschlossene Doktorarbeiten	
Ein Lichtschalter für Spermien <i>Vera Jansen</i>	91
Wie fängt man Proteine ein? <i>Shatanik Mukherjee</i>	101
Ligandenbindung von Schrittmacher-Ionenkanälen <i>Holger Fehlaue</i>	107
Wie beeinflusst die Anreicherung von Lipiden die männliche Fruchtbarkeit? <i>Diana Nancy Raju</i>	119
In Pirouetten zur Eizelle – dreidimensionale Bahnen von Spermien <i>Jan Jikeli</i>	129
Publikationen	137
Zahlen und Fakten	
Personal	143
Finanzen	145
Organe der Stiftung	148
caesarium	150

Mit der beiliegenden 3D-Brille können die Abbildungen im Doktorandenbericht von Jan Jikeli (ab Seite 129) sowie das Cover betrachtet werden.



Table of contents

Preface	8
Establishing a new Graduate School: The International Max Planck Research School (IMPRS) on Brain and Behavior	14
Research reports	
Department of Behavior and Brain Organization (BBO): Overview	20
What are they looking at? Building tools to understand vision in freely moving mammals	22
Rat eye movements reduce blind-spots in the overhead visual field <i>David Greenberg, Jürgen Sawinski, Damian Wallace, Jason Kerr</i>	26
Oculo-motor control in different mammalian species <i>Damian Wallace, Jürgen Sawinski, David Greenberg, Rebekah Corlew, David Fitzpatrick, Jason Kerr</i>	30
Imaging populations of neurons: watching the brain in action	34
Accurately detecting action potentials from optical data: a biophysics-based analysis <i>David Greenberg, Damian Wallace, Jason Kerr</i>	36
Extraction of Overlapping Fluorescent Features Validated by Ground Truth Data <i>Kay Voit, Damian Wallace, Jason Kerr, David Greenberg</i>	40
Accessing deeper brain structures using light <i>Alexandr Klioutchnikov, Jürgen Sawinski, Jason Kerr</i>	44
Preservatives, pesticides, UV blockers... How everyday chemicals impair human sperm function <i>Christian Schiffer, Astrid Müller, Timo Strünker</i>	50
Cred1 – The key to the heart <i>Dagmar Wachten</i>	62



Why do we need to know the structural dynamics of proteins? – On the quest for novel drugs <i>Elmar Behrmann</i>	70
Every single electron counts: The challenges of cryo-electron microscopy <i>Stephan Irsen</i>	76
Ph.D. reports	
A light switch for sperm <i>Vera Jansen</i>	90
Capturing proteins live in action <i>Shatanik Mukherjee</i>	100
Ligand binding of pacemaker ion channels <i>Holger Fehlaue</i>	106
How does lipid accumulation influence male fertility? <i>Diana Nancy Raju</i>	118
Pirouetting around the egg - three-dimensional navigation of sperm <i>Jan Jikeli</i>	128
Publications	137
Zahlen und Fakten	
Personal	143
Finanzen	145
Organe der Stiftung	148
caesarium	150

With the included 3D glasses, you can view the figures in the Ph.D. report by Jan Jikeli (starting on page 128) and the cover page.

Preface

The caesar Foundation celebrates its 20th anniversary this year. The occasion provides an opportunity to look back at the motives of the founders. Caesar was founded in July 1995 as one of the measures to compensate for the fact that the German parliament and government were moving from Bonn to Berlin after German reunification. The objective: to stimulate the science landscape in the region around Bonn and thus advance the structural change. Today, this purpose is supplemented with a clear task: as part of the Max Planck Society, caesar sets itself the goal of conducting research of the highest excellence.

Since the Max Planck Society took over responsibility for the research center in 2006, it has re-orientated its fields of research towards the neurosciences and at the same time introduced the quality standards and evaluation procedures of the Max Planck Society. With its first scientific Director, Prof. Dr. U. Benjamin Kaupp, caesar initially focussed on molecular sensory systems. Since 2013, Director Dr. Jason Kerr has widened the scientific spectrum with his Department of Behavior and Brain Organization.

These two scientific departments now form the basis for the further qualitative growth of the research center. Four research groups, each evaluated independently, have meanwhile been established: Dr. Annett Halle heads the Neuroimmunology Max Planck Research Group, which is financed entirely from third-party funding; in the Max Planck Research Group headed by PD Dr. Dagmar Wachten, the focus is on issues of molecular physiology, and the funding comes from the Minerva programme of the Max Planck Society; Dr. Elmar Behrmann's group studies the structural dynamics of proteins, and is part of the so-called *Freigeist* programme of the Volkswagen Foundation; and Dr. Jakob Macke with his Max Planck Research Group recently began its research on neural systems analysis. Further independent research groups are being planned.

The regular evaluations by internationally outstanding experts from external science institutions confirm that caesar is making good progress with its projects. This Annual Report provides an insight into the fruitful research work of the Institute.

Caesar's impetus has made a crucial contribution to the fact that a strong life sciences cluster has succeeded in establishing itself in the Cologne-Bonn region. At the University of Bonn, the LIMES Life & Medical Sciences Institute was set up back in 2000, and caesar's scientists co-operate not only in the research, but also in the teaching there. In 2007, the research center was involved in bringing the new Center for Neurodegenerative Diseases (DZNE) to Bonn. Caesar enabled the new DZNE institute to start work quickly by making laboratories available.

2007 was also the year the Max Planck Society established its Institute for Biology of Ageing in Cologne. Together with the re-oriented Max Planck Institute for Meta-



Vorwort

In diesem Jahr feiert die Stiftung caesar ihr 20-jähriges Bestehen. Anlässlich dieses Jubiläums stellt sich rückblickend noch einmal die Frage nach den Motiven der Stifter. Caesar wurde im Juli 1995 als Teil der Ausgleichsmaßnahmen für den Wegzug von Parlament und Regierung aus Bonn gegründet. Das Ziel: die Wissenschaftslandschaft in der Region rund um Bonn zu beleben und damit den Strukturwandel voranzubringen. Heute ist diese Bestimmung um einen klaren Auftrag ergänzt: Als Teil der Max-Planck-Gesellschaft hat caesar den Anspruch, Forschung auf exzellentem Niveau zu betreiben.

Seitdem die Max-Planck-Gesellschaft im Jahr 2006 die Verantwortung für das Forschungszentrum übernommen hat, hat es sich inhaltlich neu auf den Bereich der Neurowissenschaften ausgerichtet und zugleich die Qualitätsstandards und Begutachtungsverfahren der Max-Planck-Gesellschaft eingeführt. Mit seinem ersten wissenschaftlichen Direktor Prof. Dr. U. Benjamin Kaupp konzentrierte sich caesar zunächst auf Molekulare Neurosensorik. Seit 2013 erweitert Direktor Dr. Jason Kerr das wissenschaftliche Spektrum mit seiner Abteilung „Organisation des Gehirns und Verhaltens“.

Die beiden wissenschaftlichen Abteilungen bilden seither die Grundlage für das weitere qualifizierte Wachstum des Forschungszentrums. So sind inzwischen vier Forschungsgruppen mit eigener Begutachtung etabliert: Dr. Annett Halle leitet die Max-Planck-Forschungsgruppe Neuroimmunologie, die vollständig aus Drittmitteln finanziert ist; in der Max-Planck-Forschungsgruppe unter der Leitung von PD Dr. Dagmar Wachten stehen Fragen der molekularen Physiologie im Mittelpunkt, sie wird aus dem Minerva-Programm der Max-Planck-Gesellschaft gefördert; mit der strukturellen Dynamik von Proteinen befasst sich die Gruppe von Dr. Elmar Behrmann, die zum sogenannten Freigeist-Programm der VolkswagenStiftung gehört; und seit Neuestem forscht Dr. Jakob Macke mit seiner Max-Planck-Forschungsgruppe im Bereich der neuronalen Systemanalyse. Weitere selbstständige Forschungsgruppen sind in Planung.

Dass caesar mit seinen Vorhaben auf einem guten Weg ist, belegen die regelmäßigen Begutachtungen durch international herausragende Experten externer Wissenschaftseinrichtungen. Dieser Jahresbericht gibt einen Einblick in die fruchtbare Forschungsarbeit des Instituts.

Mit seiner Dynamik hat caesar in den vergangenen Jahren wesentlich dazu beigetragen, dass sich in der Region Köln-Bonn ein starker Cluster im Bereich der Lebenswissenschaften etablieren konnte. So entstand an der Universität Bonn bereits im Jahr 2000 das LIMES-Institut für Lebens- und Medizinwissenschaften, mit dem die Wissenschaftler von caesar nicht nur in der Forschung, sondern auch in der Lehre kooperieren. Im Jahr 2007 war das Forschungszentrum daran beteiligt,



bolism Research and the CECAD excellence cluster, to which caesar also maintains close links, the research center is actively involved in the training of doctoral students in the Cologne Graduate School of Ageing Research.

Caesar is therefore extremely well embedded in its scientific environment. The research center was and is a driving force for the structural development of the research landscape in the region. It thus fulfils an essential requirement of its founding fathers and funding providers.

The development is not yet complete, however: by opening the first transatlantic International Max Planck Research School, the IMPRS for Brain and Behavior, together with the Max Planck Florida Institute for Neuroscience, caesar will become even more attractive for junior scientists. The University of Bonn and Florida Atlantic University are partners.

Caesar thus has every reason to celebrate this anniversary. It is using the occasion to hold a wide range of events to direct the public's attention towards science. After all, excellent scientific work is and remains caesar's main concern.



das neue „Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen“ (DZNE) nach Bonn zu holen. Indem es dem DZNE Labore zur Verfügung stellte, ermöglichte caesar eine schnelle Arbeitsaufnahme des neuen Instituts.

Ebenfalls 2007 gründete die Max-Planck-Gesellschaft in Köln ihr Institut für die Biologie des Alterns. Zusammen mit dem neu ausgerichteten Max-Planck-Institut für Stoffwechselforschung und dem Exzellenzcluster CECAD, zu dem caesar ebenfalls enge Verbindungen pflegt, beteiligt sich das Forschungszentrum in der Cologne Graduate School of Ageing Research aktiv an der Ausbildung von Doktoranden.

Caesar ist also in sein wissenschaftliches Umfeld hervorragend eingebettet. Das Forschungszentrum war und ist eine treibende Kraft bei der strukturellen Entwicklung der Forschungslandschaft in der Region. Es erfüllt damit einen wesentlichen Anspruch seiner Gründerväter und Geldgeber. Und die Entwicklung ist noch nicht abgeschlossen: Mit der Eröffnung der ersten transatlantischen International Max Planck Research School, der IMPRS for Brain and Behavior, gemeinsam mit dem Max Planck Florida Institute for Neuroscience wird caesar seine Attraktivität für Nachwuchswissenschaftler weiter erhöhen. Partner sind die Universität Bonn und die Florida Atlantic University.

Caesar hat damit allen Grund, sein Jubiläum zu feiern. Zu diesem Anlass lenkt es mit einer Vielzahl von Veranstaltungen den Blick der Öffentlichkeit auf die Wissenschaft. Denn die exzellente wissenschaftliche Arbeit ist und bleibt das Hauptanliegen von caesar.



A handwritten signature in black ink, appearing to be 'M. Stratmann'.

Prof. Dr. Martin Stratmann
Präsident der Max-Planck-Gesellschaft
Vorsitzender des Stiftungsrates



A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'U. B. Kaupp'.

Prof. Dr. U. Benjamin Kaupp
Geschäftsführender Direktor



A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Jason Kerr'.

Dr. Jason Kerr
Direktor



A handwritten signature in black ink, appearing to be 'G. Bilski'.

Gertrud Bilski
Kaufmännische Geschäftsführerin

Establishing a new Graduate School: The International Max Planck Research School (IMPRS) on Brain and Behavior

The IMPRS program initiated by the Max Planck Society operates with partner Universities to create ideal research conditions for training the next generation of scientists working towards obtaining a Ph.D. Through seminars, lecture series and intensive training workshops this structured Ph.D. training program offers top students the opportunity to gain hands-on experience in the latest techniques available to neuroscience.

In collaboration with the Max Planck Florida Institute for Neuroscience (MPFI), the University of Bonn, and Florida Atlantic University, in June 2014 caesar applied for an International Max Planck Research School Graduate Program (IMPRS) based on Brain and Behavior. Approval was granted in December of the same year, and preparations started immediately with the aim of enrolling the first students in 2016. Jason Kerr, Director of the Department of Behavior and Brain Organization (BBO), acts as speaker of this first transatlantic IMPRS which aims to train students in the latest biological, mathematical, and technological research challenges connecting brain function to animal behavior and will bring together neuroscientists from the four partner institutes.

What is the challenge?

New technologies allowing access to circuits within the brain of the awake animal have enabled research to address questions about brain circuitry and behavior in a comprehensive manner. These tools are based on optical, electrophysiological, and genetic techniques that, when combined, provide unparalleled insight into neuronal circuits in the whole brain and are truly advancing neuroscience. For example, it is now possible to repeatedly measure activity from large neuronal populations and neuronal substructures and to reversibly activate and deactivate genetically targeted circuits in the behaving animal. Researchers are now able to address the question of how neuronal circuits encode sensory input in the freely behaving animal.

However all these new research tools require a specialized knowledge from many traditional disciplines such as mathematics, physics, physiology, and biochemistry. Thus, the challenge arises of how to best prepare the next generation of neuroscience students with the necessary knowledge to understand, use, and advance such technologies.

With the special expertise available amongst the faculty of the four partner institutions, students will receive advanced training in a large variety of topics ranging from the

Contact

Jason Kerr
Research Center caesar
Department of Behavior
and Brain Organization
Phone: +49 (0)228 9656-103
jason.kerr@caesar.de

Gründung der neuen Graduiertenschule, der „International Max Planck Research School“ (IMPRS) Gehirn und Verhalten

Kontakt

Jason Kerr

Forschungszentrum caesar

Abteilung Organisation des

Gehirns und Verhaltens

Telefon: +49 (0)228 9656-103

jason.kerr@caesar.de

Das von der Max-Planck-Gesellschaft ins Leben gerufene und mit Partneruniversitäten durchgeführte IMPRS-Programm schafft ideale Forschungsbedingungen, um die nächste Generation von Wissenschaftlern, die eine Promotion anstreben, auszubilden. Seminare, Vortragsreihen und intensive Workshops ermöglichen exzellenten Studierenden, durch dieses strukturierte Doktorandenprogramm praktische Erfahrungen mit den neuesten Techniken im Bereich der Neurowissenschaften zu sammeln.

In Zusammenarbeit mit dem Max Planck Florida Institute for Neuroscience (MPFI), der Universität Bonn und der Florida Atlantic University bewarb sich caesar im Juni 2014 für eine International Max Planck Research School mit Fokus Gehirn und Verhalten. Der Antrag wurde im Dezember des gleichen Jahres bewilligt. Jason Kerr, Direktor der Abteilung Organisation des Gehirns und Verhaltens (Behavior and Brain Organization, BBO), ist Sprecher dieser ersten transatlantischen IMPRS. Diese Schule strebt an, Doktoranden in den neuesten Fragen und Herausforderungen biologischer, mathematischer und technologischer Forschung der Verbindung von Gehirn und Verhalten auszubilden. Darüber hinaus werden Neurowissenschaftler der vier Partnerinstitute zusammengeführt. Die ersten Doktoranden sollen bereits 2016 aufgenommen werden können.

Die Herausforderung

Neue technologische Ansätze, die Zugang zu neuronalen Schaltkreisen im Gehirn wacher Tiere erlauben, ermöglichen es der Forschung auf umfassende Weise, Fragen in Bezug auf den Zusammenhang von neuronalen Netzwerken und Verhalten anzugehen. Diese Techniken umfassen optische, elektrophysiologische und genetische Techniken, die - in Kombination - nie zuvor erreichte Einblicke in neuronale Netzwerke erlauben, und stellen somit eine echte Weiterentwicklung in den Neurowissenschaften dar. Es ist nun beispielsweise möglich, die Aktivität großer neuronaler Netzwerke und Substrukturen wiederholt zu messen und gezielt Schaltkreise im sich frei bewegenden und verhaltenden Tier reversibel an- und auszuschalten. Forscher können so der Frage nachgehen, wie neuronale Schaltkreise das sensorische Eingangssignal kodieren.

Diese neuen Techniken erfordern jedoch Fachkenntnisse aus vielen traditionellen Disziplinen, wie beispielsweise Mathematik, Physik, Physiologie und Biochemie. Die Herausforderung besteht also darin, die nächste Generation von Neurowissenschaftlern mit diesen Kenntnissen auszustatten, um diese Technologien zu

understanding of ion-channels and the molecular biology of synaptic function and neurocircuits to the analysis of complex properties of animal behavior. The hope is that by combining these two Max Planck Neuroscience based institutes on both sides of the Atlantic with their respective partner Universities, this IMPRS will provide the students with an international and transatlantic network of colleagues and collaborators and encourage the further development of collaborative international research programs.





verstehen, sie zu benutzen und weiterentwickeln zu können.

Auf der Basis des an den vier Partnerinstituten vorhandenen Expertenwissens werden die Studierenden daher vielfältig ausgebildet. Die Themen reichen von einem Verständnis der Ionenkanäle über die Molekularbiologie synaptischer Funktionen und neuronaler Schaltkreise bis hin zur Analyse komplexer Eigenschaften des Tierverhaltens. Durch den Zusammenschluss beider Max-Planck-Institute sowie deren Partneruniversitäten soll erreicht werden, dass den IMPRS-Studierenden auf beiden Seiten des Atlantiks eine weitreichende Vernetzung ermöglicht wird und darüber hinaus die Weiterentwicklung internationaler, gemeinschaftlicher Forschungsprogramme angeregt wird.



Forschungsberichte
Research reports

Department of Behavior and Brain Organization (BBO): Overview

The research of the Department of Behavior and Brain Organization (BBO) aims to understand how mammals use vision to make decisions and the underlying principles of the neural circuits involved in this process. As many sensory based decisions involve a combination of head movements, vestibular driven eye movements, vestibular driven cortical activity and active sensing of the environment, the BBO scientists focus on studying the freely moving animal. To this end BBO uses and develops techniques to study the freely behaving animal that range from sophisticated position and pose tracking techniques to techniques for imaging activity from populations of cortical neurons with cellular resolution. To achieve this BBO has taken a multidisciplinary approach comprised of multiphoton imaging techniques, eye and head tracking techniques, computational approaches and behavioral paradigms. This has afforded the opportunity to measure the spatiotemporal organization of activity in populations of neurons during free behavior and to quantify the strategies employed by the animal in the course of performing the observed behavior.

Over the past 12 months BBO has focused on setting up the core projects that define its research agenda. What follows is a brief overview of some of the more mature projects that are coming to fruition and an introduction to some of the staff that are undertaking the research.

Contact

Jason Kerr
Research Center caesar
Department of Behavior
and Brain Organization
Phone: +49 (0)228 9656-103
jason.kerr@caesar.de

Abteilung Organisation des Gehirns und Verhaltens: Überblick

Kontakt

Jason Kerr

Forschungszentrum caesar

Abteilung Organisation des

Gehirns und Verhaltens

Telefon: +49 (0)228 9656-103

jason.kerr@caesar.de

Das Ziel der Abteilung Organisation des Gehirns und Verhaltens (Behavior and Brain Organization, BBO) ist es zu verstehen, wie Säugetiere anhand ihres Sehvermögens Entscheidungen treffen, und die Grundprinzipien der daran beteiligten neuronalen Schaltkreise zu erforschen. Wie bei vielen mithilfe von Sinneseindrücken getroffenen Entscheidungen greifen auch hier Kopfbewegungen, vestibulär gesteuerte Augenbewegungen und kortikale Aktivität sowie die aktive Erfassung der Umgebung ineinander. Die Wissenschaftler der BBO konzentrieren sich dabei auf die Untersuchung sich frei bewegender Tiere, wobei die zu diesem Zweck angewandten und entwickelten Methoden von komplexen Position- und Pose-Tracking-Systemen bis hin zu Techniken zur bildlichen Darstellung der Aktivität von Populationen kortikaler Neuronen (Auflösung bis zur Zellebene) reichen. Die Abteilung verfolgt einen multidisziplinären Ansatz, bei dem Multiphotonen-Bildgebungs-Techniken, Augen- und Kopf-Tracking-Systeme, computerbasierte Methoden und Verhaltensparadigmen Anwendung finden. Dies ermöglicht die Messung der raumzeitlichen Organisation der Aktivität von Neuronenpopulationen in einem sich natürlich verhaltenden Tier sowie die quantitative Erfassung der von dem Tier im Laufe seines beobachteten Verhaltens eingesetzten Strategien.

In den letzten 12 Monaten konzentrierte sich die Arbeit unserer Abteilung auf die Planung der Kernprojekte unserer Forschungsagenda. Im Anschluss werden einige der weiter fortgeschrittenen Projekte sowie die damit beschäftigten Mitarbeiter kurz vorgestellt.

What are they looking at? Building tools to understand vision in freely moving mammals

Eye movements are what make vision an active sense and this is thought to also contribute to the disambiguation of self-generated motion and motion in the environment. For this purpose a whole suite of reflexes and voluntary movements have evolved that 1) move the eyes to compensate for head movements of the viewing animal and 2) track an object of fixation. The presence of two eyes, and therefore two images of the world, requires the brain not only to process images from both eyes but also to solve the problem of whether the eyes are detecting one object or two. How the eyes move relative to each other underlies, in part, how this is achieved. From the perspective of neuronal circuits in the cortex the key question is how populations of neurons decode the information coming simultaneously from both eyes to generate a cohesive view of the world which is of benefit to the animal. To address this question not only do we have to record activity from populations of cortical neurons, but we also have to understand how the eyes move relative to the surrounding environment and relative to each other during free behavior.

To this end we designed and manufactured a light-weight, high-speed infrared oculo-videography system for recording images of each eye in freely moving animals [11]. Determining the line of sight for each eye also requires simultaneous and accurate tracking of the position and orientation of the animal's head. To achieve this we also developed a camera-based position tracking system with an accuracy of $\ll 1$ degree [11]. Combining this with a complete 3D model of the animal's environment we can precisely reconstruct the visual scene entering each eye. Using this system we recently showed that movements of the two eyes in freely moving rats differ fundamentally from the precisely controlled eye movements used by other mammals to maintain continuous binocular fusion (the seamless merging of our left and right eye images into a single view of the world around us).

We showed that the observed eye movements serve to keep the visual fields of the two eyes continuously overlapping above the animal during free movement, but not continuously aligned. The extent of the misalignment is such that either these animals use a very different mechanism than we do in order to merge the left and right eye images, or alternatively that they do not continuously see a single view of the world. This eye movement strategy does, however, minimize blind spots in the visual field above the animal. By testing the behavioral responses of rats to objects moving around them we showed that rats display a strong and consistent shelter-seeking response when visual stimuli are presented above them, but not when the same stimuli are presented next to them. These eye movements may therefore be of

Contact

Jason Kerr

Research Center caesar

Department of Behavior

and Brain Organization

Phone: +49 (0)228 9656-103

jason.kerr@caesar.de

Was sehen sie? – Technische Entwicklungen zur Erforschung der visuellen Wahrnehmung bei sich frei bewegenden Säugetieren

Kontakt

Jason Kerr

Forschungszentrum caesar

Abteilung Organisation des

Gehirns und Verhaltens

Telefon: +49 (0)228 9656-103

jason.kerr@caesar.de

Augenbewegungen machen das Sehen zu einem aktiven Sinn. Man vermutet, dass diese Bewegungen der Augen zur Unterscheidung selbsterzeugter Bewegungen und Bewegungen in der Umwelt beitragen. Zu diesem Zweck hat sich eine ganze Reihe von Reflexen und bewussten Augenbewegungen entwickelt, die Kopfbewegungen ausgleichen oder einem fixierten Objekt folgen. Die Existenz zweier Augen und daher zweier Bilder der Umwelt bedeutet, dass das Gehirn nicht nur zwei Bilder verarbeiten, sondern auch entscheiden muss, ob es sich um ein oder tatsächlich zwei Objekte handelt. Wie sich die Augen zueinander bewegen, bestimmt zum Teil, wie das Gehirn diese Aufgaben meistert. Wie können Neuronenpopulationen die Informationen beider Augen so entschlüsseln, dass sich für das Tier ein zusammenhängendes Bild seiner Umgebung ergibt? Um dies zu beantworten, müssen wir nicht nur die Aktivität kortikaler Neuronenpopulationen messen, sondern auch verstehen, wie sich die Augen relativ zu der umliegenden Umgebung und zueinander bewegen – bei natürlichem Verhalten der Tiere.

Zu diesem Zweck entwarfen wir ein leichtes Hochgeschwindigkeits-Infrarot-Videookulographie-System zur Aufzeichnung von Bildern beider Augen von sich frei bewegenden Tieren [11]. Um die jeweilige Blickrichtung bestimmen zu können, müssen Position und Ausrichtung des Kopfes simultan und präzise verfolgt werden. Wir entwickelten hierfür ein kamerabasiertes Positions-Tracking-System mit einer Genauigkeit deutlich unter 1° [11]. In Kombination mit einem vollständigen 3D-Modell der Umgebung des Tieres lässt sich das von beiden Augen wahrgenommene Bild genau rekonstruieren. Mit Hilfe dieses Systems konnten wir kürzlich zeigen, dass sich die Augenbewegungen von sich frei bewegenden Ratten von den präzise gesteuerten Augenbewegungen anderer Säugetiere unterscheiden, deren Augen binokulare Fusion (das scheinbare Verschmelzen des rechten und linken Bildes des jeweiligen Auges in ein einziges Bild, das die Umwelt repräsentiert) aufweisen.

Die bei Ratten beobachteten Augenbewegungen hingegen haben zur Folge, dass sich die Gesichtsfelder beider Augen oberhalb des sich frei bewegenden Tieres kontinuierlich überschneiden; sie werden nicht stetig aneinander ausgerichtet. Das Ausmaß der Richtungsabweichung lässt vermuten, dass die Tiere zur Verschmelzung der Bilder des rechten und linken Auges entweder einen ganz anderen Mechanismus anwenden als wir oder eben nicht immer ein einziges Bild der Welt sehen. Ein Vorteil dieser Strategie ist aber, dass blinde Flecken im Gesichtsfeld oberhalb des Tieres minimiert werden. In Verhaltensexperimenten konnten wir feststellen,



substantial evolutionary benefit by enhancing predator detection. The following are two projects addressing some of the questions arising from this finding.

dass Ratten bei einer visuellen Stimulation durch ein Objekt über dem Kopf durchweg schutzsuchend reagierten - im Falle eines visuellen Reizes neben ihnen jedoch nicht. Diese Augenbewegungen sind möglicherweise von erheblichem evolutionärem Vorteil, weil die Ratten so besser Fressfeinde entdecken können. Im Folgenden stellen wir zwei Projekte vor, die weitergehende Fragen zu diesem Thema adressieren.

Rat eye movements reduce blind-spots in the overhead visual field

David S. Greenberg*, Jürgen Sawinski*, Damian J. Wallace*, and Jason N. D. Kerr

Defense against predation from above, particularly from birds of prey, may have been a strong selective pressure in the evolution of eye movement in rats. Indeed, their eye movements maintain an overlap overhead of left and right eye visual fields continuously during movement [11]. This project aimed to assess to what extent their eye movements reduce blind spots in the visual field. During nose-down pitch of the head, VOR-induced temporal movement of both eyes compensates for the movement of the head, with the result that visual coverage above and behind the animal is not diminished (Figure 1a, b). Reconstructing the visual fields using the same head-pitch data but excluding eye movements (Figure 1c), the direction directly overhead is no longer viewed by either eye.

Averaged for 3 animals and 5 recording sessions, the total area within the animals combined left and right eye visual field included 76.9% of all space above the horizon or 15868.6 square degrees (Figure 1d). With the eyes fixed to their mean positions

Contact

Jürgen Sawinski
 Research Center caesar
 Department of Behavior
 and Brain Organization
 Phone: +49 (0)228 9656-302
jurgen.sawinski@caesar.de

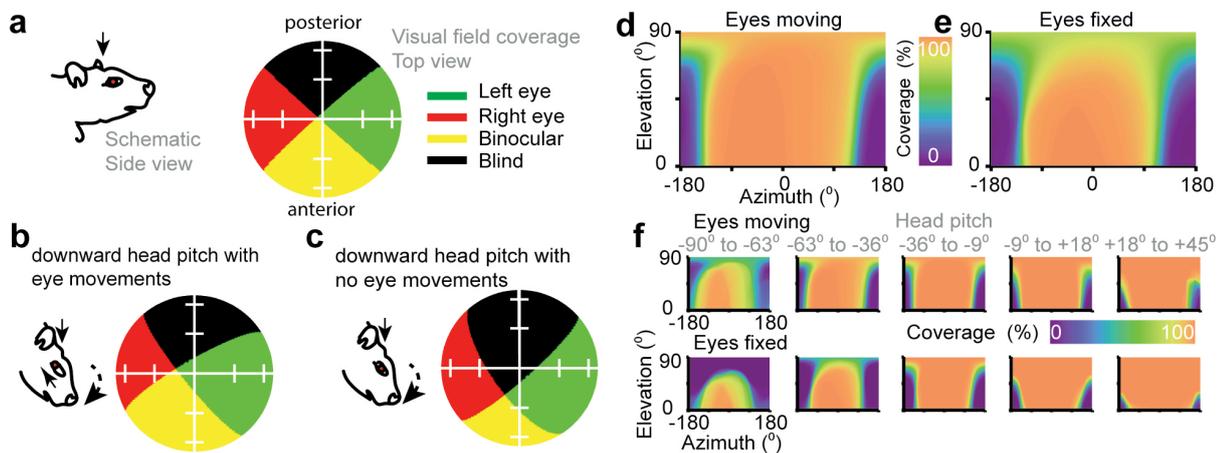


Figure 1: Effect of eye movements on visual coverage in the rat. a. spherical plot of the visual coverage of a rat with the head in normal anatomical orientation (approx. 0° pitch and roll). Acceptance angle of eye 180°. b. spherical visual coverage plot observed with large amplitude nose-down head pitch. c. visual coverage plot with the same nose-down head pitch but excluding the effect of the observed eye movements. d. average visual coverage plot represented as a 2-dimensional map calculated for all data and including the observed eye movements. Azimuth represents the bearing from an origin pointing directly away from the animals nose in the horizontal plane, and elevation represents the vertical angle above the horizon. e. visual coverage plot calculated when eye positions were set to the median positions. f. coverage plots calculated with eye movements (upper) and with eyes fixed to median positions (lower) for differing degrees of head pitch.

Bewegung der Augen bei Ratten reduziert blinde Flecken im Gesichtsfeld oberhalb des Kopfes

David S. Greenberg*, Jürgen Sawinski*, Damian J. Wallace* und Jason N. D. Kerr

Kontakt

Jürgen Sawinski

Forschungszentrum caesar

Abteilung Organisation des

Gehirns und Verhaltens

Telefon: +49 (0)228 9656-302

juergen.sawinski@caesar.de

Die Abwehr von Fressfeinden aus der Luft, speziell von Raubvögeln, könnte in der Evolution der Augenbewegungen einen starken Selektionsdruck auf die Ratten ausgeübt haben. In der Tat bewirken die Augenbewegungen, dass sich die Gesichtsfelder des linken und rechten Auges oberhalb des Kopfes während der Bewegung kontinuierlich überschneiden [11]. Hier wurde untersucht, inwieweit die Augenbewegungen der Ratte blinde Flecken im Gesichtsfeld reduzieren. Eine wichtige Rolle spielt hierbei der vestibulookuläre Reflex (VOR), der als Hirnstammreflex eine stabile visuelle Wahrnehmung auch bei plötzlicher Kopfbewegung ermöglicht. Senkt sich der Kopf nach unten, kompensiert die VOR-induzierte temporale (und somit gegenläufige) Bewegung beider Augen die Kopfbewegung. So ist der Bereich der visuellen Reizerfassung über und hinter dem Tier nicht eingeschränkt (Abbildung 1a, b). Geht man jedoch von fixierten Augen aus, so zeigt die Analyse dieser Daten, dass bei starker Kopfbewegung nach unten der Bereich direkt über dem Kopf in diesem Fall von keinem der beiden Augen mehr wahrgenommen werden kann (Abbildung 1c).

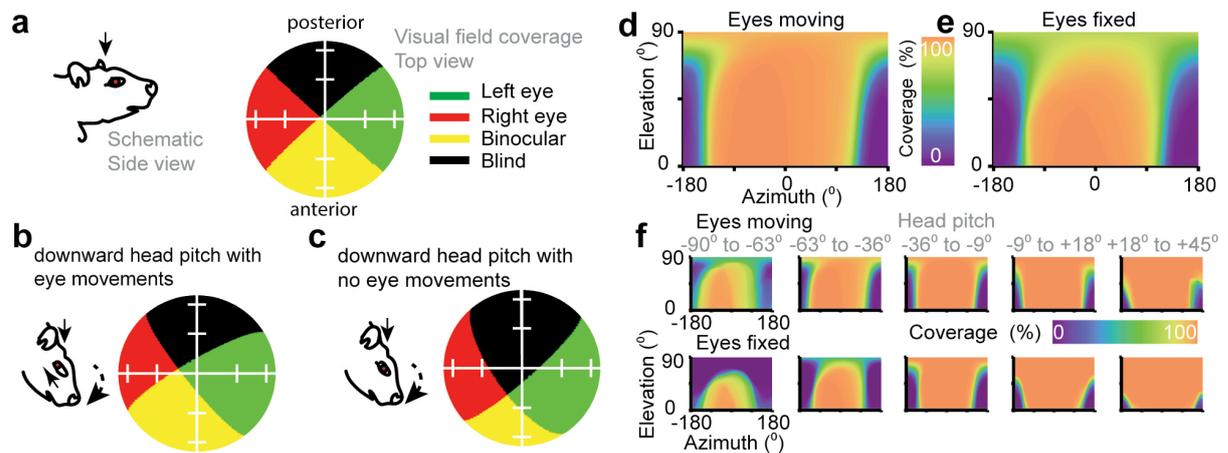


Abbildung 1: Auswirkungen der Augenbewegungen auf den visuellen Erfassungsbereich der Ratte. a. Kugeldiagramm des visuellen Erfassungsbereichs der Ratte bei normaler anatomischer Ausrichtung des Kopfes (Nick- und Rollwinkel: ca. 0°). Öffnungswinkel des Auges: 180° . b. Kugeldiagramm des visuellen Erfassungsbereichs bei starker Bewegung des Kopfes nach unten. c. Kugeldiagramm des visuellen Erfassungsbereichs bei derselben Kopfbewegung, jedoch ohne den Effekt der beobachteten temporalen Augenbewegungen. d. Unter Berücksichtigung der Augenbewegungen berechneter durchschnittlicher visueller Erfassungsbereich, dargestellt als zweidimensionale Karte. Azimut stellt die direkt von der Nase des Tieres weg zeigende Peilrichtung in der horizontalen Ebene dar, die Elevation den vertikalen Winkel über dem Horizont. e. Darstellung des visuellen Erfassungsbereiches, berechnet bei Einstellung der Augen auf die jeweils mediane Position. f. Darstellung des visuellen Erfassungsbereiches, berechnet für unterschiedliche Neigungswinkel des Kopfes, bei Augenbewegungen (oben) und bei fixierten Augen (unten).

the total covered area above the horizon reduced to 67.9% (14011.8 square degrees, Figure 1e), which shows that eliminating the observed eye movements introduces an additional blind spot of 1856.8 square degrees. The time when a ground dwelling rodent is most in danger from aerial attack is likely to be while it has its head down during foraging. We therefore next examined the effects of overhead visual coverage during different degrees of head pitch. The dataset was divided into five equally sized bins based on head pitch and coverage maps calculated for each bin, both including the effects of the observed eye movements and when fixing the eyes to their average positions (figure 1f). The differences in coverage above the horizon with and without eye movements was greatest during extreme downward pitch (figure 1f, first column), when the direction directly above the head was covered by at least one eye 49.1% of the time but would never have been covered by either eye if the eyes had been fixed to their mean positions. We conclude from this that the observed eye movements serve to minimize blind spots in the visual space above the animal while it is moving.

Die Gesamtfläche der kombinierten Gesichtsfelder des linken und rechten Auges betrug mit Augenbewegungen (bei drei Tieren und fünf Messungen) durchschnittlich 76,9% des gesamten über dem Horizont liegenden Raumes (Abbildung 1d). Wären die Augen in Mittelstellung fixiert, betrüge die erfasste Gesamtfläche über dem Horizont nur noch 67,9% (Abbildung 1e). Dies zeigt, dass ohne die beobachteten Augenbewegungen ein weiterer blinder Fleck entstünde. Für einen am Boden lebenden Nager ist die Gefahr eines Angriffs aus der Luft wahrscheinlich am größten, wenn er während der Futtersuche den Kopf gesenkt hält. Wir untersuchten deshalb den Bereich, den die Ratten visuell erfassen, bei verschiedenen Neigungswinkeln des Kopfes. Der Datensatz wurde anhand der Neigungswinkel in fünf gleich große Gruppen unterteilt. Für jede Gruppe haben wir eine Karte des visuellen Wahrnehmungsbereiches erstellt, einmal mit und einmal ohne die beobachteten Augenbewegungen (Abbildung 1f). Der Unterschied war bei extremer Neigung des Kopfes am größten. Der Bereich oberhalb des Kopfes wird durch die Augenbewegungen von mindestens einem der beiden Augen über 49,1% der Zeit erfasst (Abbildung 1f, erste Spalte). Wären im Gegensatz dazu die Augen in Mittelstellung fixiert gewesen, hätten sie den Bereich gar nicht erfassen können. Wir schließen daraus, dass die Augenbewegungen zur Minimierung blinder Flecken im Gesichtsfeld oberhalb des sich bewegenden Tieres dienen.

Oculo-motor control in different mammalian species

Damian J. Wallace*, Jürgen Sawinski*, David S. Greenberg*, Rebekah Corlew, David Fitzpatrick, and Jason N. D. Kerr

Within class mammalia how wide-spread are non-conjugate eye movements? Do other mammals also employ a strategy of maintaining panoramic surveillance at the expense of continuous fusion? Are there common factors that lead to non-conjugate or conjugate eye movements? In this project we have expanded our investigation of eye movements in freely moving animals to include representatives of the mammalian orders Carnivora and Scandentia. Within order Carnivora we have recorded from the ferret (*Mustela putorius furo*). Within order Scandentia, we recorded eye and head movements from the common tree shrew (*Tupaia glis*). In ferrets, like in rats, there is a strong relationship between horizontal eye position and head pitch (Figure 2a). Nose-down head pitch of -60 degrees or greater resulted in strong divergent movements of both left and right eyes, resulting in both pupils being located in the temporal corner of the eye (see insert in Figure 2b). Vertical eye movements in ferrets, unlike rats, lack a strong relationship to head roll, with vertical eye movements appearing more conjugate. To express relative alignment between left and right eye fields of view, we calculated the difference in left and right pupil positions (Figure 2b). If ocular alignment is maintained like in humans, the plot would have a tight distribution around the origin, which is not the case. With strong negative (nose down) pitch both eyes diverge, resulting in a scatter of points in this plot along the negative x-axis like we observed in rats. However, there is relatively little scatter along the y-axis, indicative of conjugate-like vertical movements. Together this suggests that ocular

Contact

Damian Wallace
 Research Center caesar
 Department of Behavior
 and Brain Organization
 Phone: +49 (0)228 9656-314
 damian.wallace@caesar.de

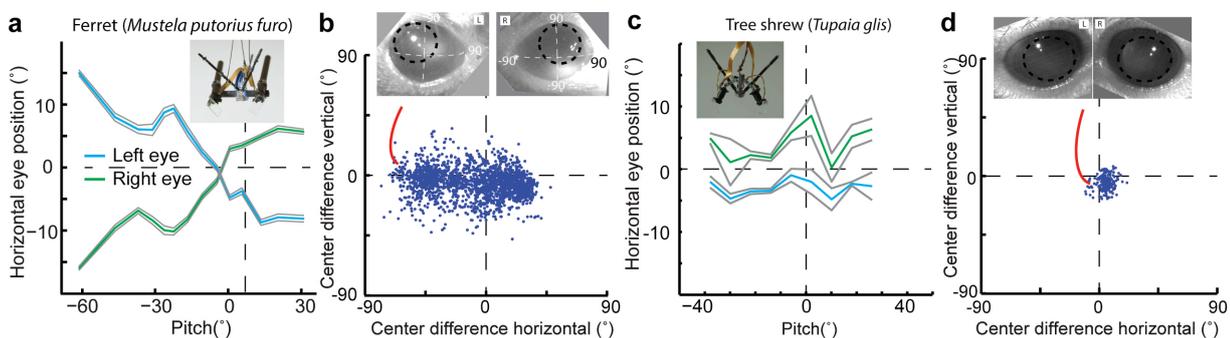


Figure 2: Ocular videography in ferrets and shrews. a. relation between horizontal pupil position and head pitch for ferrets. Insert, headmounted ocular videography system for ferrets. b. left/right pupil center position difference plot for the ferret dataset. Position of left pupil center minus that of right. Spherical axes for pupil center measurements are indicated in the insert. c. relation between horizontal pupil position and head pitch for tree shrews. Insert, headmounted system for tree shrews. d. pupil center position difference plots for shrew dataset.

Okulomotorische Steuerung bei verschiedenen Säugetieren

Damian J. Wallace*, Jürgen Sawinski*, David S. Greenberg*, Rebekah Corlew, David Fitzpatrick und Jason N. D. Kerr

Kontakt

Damian Wallace

Forschungszentrum caesar

Abteilung Organisation des
Gehirns und Verhaltens

Telefon: +49 (0)228 9656-314

damian.wallace@caesar.de

Wie weit verbreitet sind nicht-parallele Augenbewegungen bei Säugetieren? Wenden andere Säugetiere als Ratten ebenfalls die Strategie einer "Panoramaübersicht" auf Kosten einer kontinuierlichen Verschmelzung der beiden Sehfelder an? Gibt es gemeinsame Merkmale, die zu der einen oder anderen Strategie führen? Bei diesem Projekt haben wir unsere Analyse der Augenbewegungen auf Stellvertreter der Säugetierordnungen *Carnivora* (Fleischfresser) und *Scandentia* (Spitzhörnchen) ausgeweitet. Bei den Fleischfressern untersuchten wir das Frettchen (*Mustela putorius furo*). Innerhalb der Ordnung der *Scandentia* maßen wir die Augen- und Kopfbewegungen des Spitzhörnchens (*Tupaia glis*). Bei Frettchen besteht wie bei Ratten eine enge Beziehung zwischen horizontaler Augenposition und Kopfneigung (Abbildung 2a). Eine Kopfneigung nach unten von -60 Grad oder mehr führte zu ausgeprägten divergenten Bewegungen des rechten und linken Auges. Dies hatte zur Folge, dass sich die Pupillen jeweils im temporalen Augenwinkel befanden (siehe eingefügtes Bild in Abbildung 2b). Anders als bei Ratten stehen vertikale Augenbewegungen beim Frettchen in keiner engen Beziehung zur seitlichen Neigung des Kopfes. Als Maß für die Ausrichtung der Gesichtsfelder beider Augen dient uns die Differenz der Position der linken Pupille und der Position der rechten Pupille. Bei einer Ausrichtung der Augen wie beim Menschen würde das Diagramm eine enge Verteilung um den Nullpunkt herum aufweisen. Dies ist bei Frettchen nicht der Fall. Bei einer starken Neigung nach unten gehen die Augen weit auseinander.

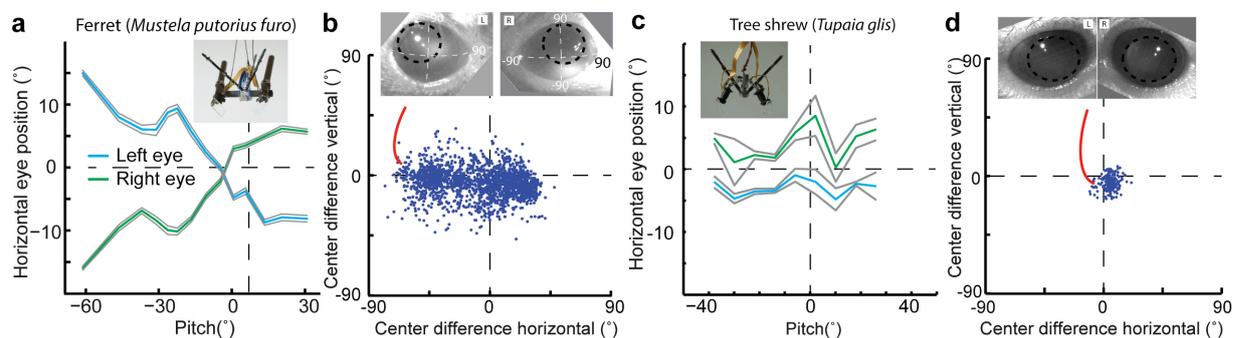


Abbildung 2: Video-Okulographie bei Frettchen und Spitzhörnchen. a. Beziehung zwischen horizontaler Pupillenposition und Kopfneigung bei Frettchen. Eingefügtes Bild: am Kopf befestigtes Video-Okulographie-System (Frettchen). b. Das Diagramm zeigt die Differenz der Positionen beider Pupillenmittelpunkte bei Frettchen. Die Kugelachsen zur Messung dieser Pupillenmittelpunkte sind in dem eingefügten Bild dargestellt. c. Beziehung zwischen horizontaler Pupillenposition und Kopfneigung bei Spitzhörnchen. Eingefügtes Bild: am Kopf befestigtes Video-Okulographie-System (Spitzhörnchen). d. Das Diagramm zeigt die Differenz der Positionen beider Pupillenmittelpunkte bei Spitzhörnchen.

alignment is maintained in the vertical but not in the horizontal axis.

Eye movements in tree shrews were distinct from those observed in rats and ferrets. Their eye movements consisted mainly of small amplitude, but extremely rapid, saccade-like movements which appeared on initial viewing to be mainly conjugate (Figure 2c). The pupil center position difference plot calculated for these data shows a very tight distribution around zero.

These results show that rats, ferrets and tree shrews each display distinct and different coordination of eye movements, with each having different implications for the cortical mechanisms underlying binocular fusion.



Dies führt zu einer Streuung der Punkte entlang der negativen x-Achse, wie wir sie bei Ratten beobachtet haben. Entlang der y-Achse zeigt sich jedoch nur eine relativ geringe Streuung, was auf eher gleichgerichtete vertikale Bewegungen deutet. Zusammenfassend können wir festhalten, dass die Augen beim Frettchen in der vertikalen, nicht aber in der horizontalen Achse gleich ausgerichtet sind.

Die Augenbewegungen der Spitzhörnchen unterscheiden sich von denen bei Ratten und Frettchen. Es handelt sich dabei um meist kleinamplitudige, jedoch extrem rasche, eher sakkadierte Bewegungen, die zu Beginn überwiegend gleichgerichtet erscheinen (Abbildung 2c). Das Diagramm zur Differenz der Pupillenpositionen weist eine sehr enge Verteilung um den Nullpunkt auf.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Koordination der Augenbewegungen bei Ratten, Frettchen und Spitzhörnchen verschieden ist. Dies deutet auf unterschiedliche kortikale Mechanismen hin, die einer Verschmelzung der Sehfelder beider Augen zugrunde liegen.

Imaging populations of neurons: watching the brain in action

Neurons, the computational units of the brain, do not operate in isolation but as parts of a complex system, with each one receiving synaptic connections from many thousands of others. Each neuron receives excitatory and inhibitory inputs through these connections, and through a process not yet understood, generates its own activity to be transmitted via action-potential propagation to the thousands of neurons which receive its output connections. How an animal uses this process to understand the surrounding world and make accurate decisions is a central focus of neuroscience, and remains largely an open question. One of the major challenges in addressing this question has been the difficulty of obtaining accurate and unambiguous measurements of how action potentials propagate through networks of interconnected neurons while an animal perceives, decides and acts. While electrode-based, extracellular electrical recordings have been instrumental to our current understanding of brain function, they cannot unambiguously assign spiking activity across populations of simultaneously recorded neurons [4].

With the development of both multi-photon microscopy [1] and genetically-based fluorescent activity indicators [10] it is now possible to measure action-potential generated activity from neuronal populations, with unambiguous resolution of single action potentials in single neurons. Imaging activity from neuronal populations using a combination of multi-photon imaging (for review see [4]), targeted electrophysiology [5], activity indicators, and genetic markers [13] gives unparalleled access to cortical neuronal circuits and affords several advantages over previous techniques [12]. Multi-photon imaging of neuronal activity not only provides spatial resolution and morphological identification, but also spike-activity detection in all neurons within the imaged area, even those with low rates of action potential discharge [2]. This provides a complete picture of the local population's activity, making possible the quantification of both pairwise and higher-order correlations that arise from the complex network of connections between neurons [2;3]. Population imaging during sensory stimulation also allows stimulus-response properties such as receptive-fields to be mapped in many identified neurons simultaneously. Most importantly, all these quantifications of action potential discharge at the single-neuron and population levels can be related back to each neuron's cell type and spatial location on both fine and coarse anatomical scales.

Contact

Jason Kerr
Research Center caesar
Department of Behavior
and Brain Organization
Phone: +49 (0)228 9656-103
jason.kerr@caesar.de

Bildgebung von Neuronenpopulationen: Dem Gehirn bei der Arbeit zusehen

Kontakt

Jason Kerr

Forschungszentrum caesar

Abteilung Organisation des
Gehirns und Verhaltens

Telefon: +49 (0)228 9656-103

jason.kerr@caesar.de

Neuronen sind die Recheneinheiten des Gehirns. Sie arbeiten nicht isoliert, sondern in einem komplexen System. Jedes Neuron ist durch synaptische Verbindungen mit vielen tausend anderen Neuronen verknüpft. Über diese Verbindungen empfängt es erregende (exzitatorische) und hemmende (inhibitorische) Informationen und erzeugt durch einen bislang noch nicht geklärten Prozess eigene Aktivität. Diese Aktivität wird mit Hilfe von Aktionspotentialen verbreitet und an viele tausend andere Neuronen übermittelt. Die Frage, wie Tiere dadurch ihre Umwelt verstehen und richtige Entscheidungen treffen, ist ein Schwerpunkt der Neurowissenschaft und größtenteils nach wie vor ungeklärt. Wie sich Aktionspotentiale ausbreiten, während das Tier seine Umwelt wahrnimmt, Entscheidungen trifft und handelt, ließ sich bislang kaum präzise und eindeutig bestimmen. Zwar sind extrazelluläre elektrische Messungen auf Elektrodenbasis durchaus hilfreich für unser aktuelles Verständnis der Gehirnfunktion; eine eindeutige Zuordnung der Aktivität in Populationen gleichzeitig aufgezeichneter Neuronen ist damit jedoch nicht möglich [4].

Durch die Entwicklung der Multiphotonenmikroskopie [1] sowie fluoreszierender Indikatoren auf genetischer Basis [10] kann man heutzutage die Aktivität neuronaler Populationen messen. Es lassen sich dabei einzelne Aktionspotentiale in einzelnen Neuronen eindeutig identifizieren. Die Erfassung der Aktivität neuronaler Populationen durch eine Kombination aus Multiphotonen-Bildgebung (Review: siehe [4]), gezielter Elektrophysiologie [5], Aktivitätsindikatoren und genetischen Markern [13] ermöglicht den beispiellosen Zugang zu neuronalen Schaltkreisen des Kortex und bietet gegenüber früheren Techniken vielfältige Vorteile [12]. Die Darstellung der neuronalen Aktivität mit Multiphotonen-Bildgebung erlaubt nicht nur die räumliche Auflösung und morphologische Bestimmung, sondern auch den Nachweis von Aktivität aller Neuronen innerhalb des untersuchten Bereichs, selbst derjenigen mit niedrigen Raten von Aktionspotentialen [2]. Auf diese Weise entsteht ein vollständiges Bild der Aktivität der lokalen neuronalen Population. So können Korrelationen (paarweise und höherer Ordnung), die sich aus dem komplexen neuronalen Netzwerk ergeben, quantitativ erfasst werden [2;3]. Die Darstellung der Population durch bildgebende Verfahren während sensorischer Stimulation erlaubt zudem die gleichzeitige Kartierung von Reiz-Reaktions-Charakteristika, wie etwa rezeptiven Feldern von Neuronen. Am wichtigsten ist jedoch, dass sich anhand der quantitativen Erfassung der Aktionspotentiale auf der Ebene einzelner Neuronen und neuronaler Populationen Rückschlüsse auf den neuronalen Zelltyp und die räumliche Lage ziehen lassen.

Accurately detecting action potentials from optical data: a biophysics-based analysis

David S. Greenberg, Damian J. Wallace, and Jason N. D. Kerr

Neuronal activity can be measured optically using fluorescent sensors that increase their brightness during the calcium influx caused by action potentials in neurons. Consequently, the accuracy of this recording technique depends on our understanding of the relationship between optical signals and the underlying action potentials and calcium influx. But what precisely is this relationship, and how accurately can action potentials be inferred from measured fluorescence?

We initially addressed these questions by labelling populations of cortical neurons with synthetic small-molecule indicators, and then using combined single-cell electrophysiology and two-photon imaging of neuronal populations to record fluorescence signals and electrical 'ground truth' from the same neuron simultaneously (Kerr, Greenberg *et al.* 2005). From these recordings we were able to construct algorithms capable of detecting single-action potentials with single neuron accuracy (Kerr, Greenberg *et al.* 2005; Kerr, de Kock *et al.* 2007; Greenberg, Houweling *et al.* 2008) over a wide range of activity rates. Using this approach we were able to infer ~95% of all action-potentials over many neurons with a very low false positive (~0.03 Hz) rate. From this we were able to quantify higher-order correlations statistics across neuronal populations (Kerr, de Kock *et al.* 2007; Greenberg, Houweling *et al.* 2008) and map receptive-fields of many identified neurons in the freely moving animal (Sawinski, Wallace *et al.* 2009) and relate this activity back to the rendered 3D environment.

Recently, protein-based calcium indicators have begun to replace synthetic small-molecule indicators for the measurement of neuronal population activity, due to two major advantages. First, protein-based indicators remove the need to directly pressure-inject calcium indicators into the brain immediately before each imaging session, resulting in a considerably less invasive procedure. Second, while small-molecule indicators allow only a single recording session of few hours, with protein-based indicators the same population of neurons can be imaged repeatedly for a week. However, these new indicators label brain tissue non-uniformly, and display a complex, non-linear relationship to action potential discharge due to the cooperative binding of multiple calcium ions to each indicator molecule. As a result, using them to accurately infer spiking has not been achieved.

To address the complex, non-linear relationship between action potential discharge and measured fluorescence signals, we set out to develop a new class of algorithms for detecting action-potentials from both protein-based and organic sensors. We developed a mathematical framework for matching observed fluorescence data to a biophysical model (Figure. 1a) incorporating calcium entry and extrusion, multiple

Contact

David Greenberg
Research Center caesar
Department of Behavior
and Brain Organization
Phone: +49 (0)228 9656-303
david.greenberg@caesar.de

Wie Aktionspotentiale aus optischen Daten präzise detektiert werden können

David S. Greenberg, Damian J. Wallace und Jason N. D. Kerr

Kontakt

David Greenberg
Forschungszentrum caesar
Abteilung Organisation des
Gehirns und Verhaltens
Telefon: +49 (0)228 9656-303
david.greenberg@caesar.de

Die neuronale Aktivität lässt sich optisch mithilfe fluoreszierender Farbstoffe messen, deren Helligkeit während des Einstroms von Kalzium – ausgelöst durch Aktionspotentiale in den Neuronen – zunimmt. Wie genau wir messen können, hängt davon ab, wie gut wir die Beziehung von optischen Signalen, Aktionspotentialen und Kalziumeinstrom verstehen. Wie genau sieht diese Beziehung aus? Wie präzise lässt sich aus der gemessenen Fluoreszenz auf die Aktionspotentiale schließen?

Um diese Fragen zu beantworten, markierten wir zunächst Populationen kortikaler Neuronen mit kleinmolekuligen synthetischen Indikatoren. Anschließend maßen wir synchron die Fluoreszenzsignale und die elektrische *“ground truth”* eines Neurons mit Einzelzell-Elektrophysiologie und Zweiphotonen-Bildgebung [5]. Anhand dieser Messungen entwickelten wir Algorithmen, die – über ein breites Spektrum an Aktivitätsraten – einzelne Aktionspotentiale eines Neurons detektieren können [2;3;5]. Mit Hilfe dieses Ansatzes konnten wir auf ~95% aller Aktionspotentiale verschiedenster Neuronen rückschließen – mit einer sehr niedrigen Falsch-Positiv-Rate von ~0,03 Hz. Damit waren wir in der Lage, auch Korrelationen höherer Ordnung zwischen neuronalen Populationen statistisch zu erfassen [2;3]. Außerdem konnten wir bei zahlreichen Neuronen rezeptive Felder kartieren [7] und von dieser Aktivität Rückschlüsse auf die gerenderte 3D-Umgebung ziehen.

Seit einiger Zeit ersetzen Kalziumindikatoren auf Proteinbasis – also organische Indikatoren – die kleinmolekuligen synthetischen Indikatoren. Dies hat zwei Gründe: Erstens muss man diese protein-basierten Kalziumindikatoren nicht unmittelbar vor jeder bildgebenden Untersuchung per Druckinjektion direkt ins Gehirn applizieren, was das Verfahren erheblich weniger invasiv macht. Zweitens kann eine neuronale Population mit Indikatoren auf Proteinbasis eine Woche lang wiederholt untersucht werden, während kleinmolekulige Indikatoren nur eine einzige Messreihe von ein paar Stunden erlauben. Die neuen Indikatoren markieren das Hirngewebe allerdings ungleichmäßig; da mehrere Kalziumionen gleichzeitig an die einzelnen Indikatormoleküle binden, entsteht eine komplexe, nicht-lineare Beziehung. Aus diesem Grund ist es bisher nicht gelungen, mithilfe der neuen Indikatoren akkurate Rückschlüsse auf die Aktionspotentiale zu ziehen.

Um der komplexen Beziehung zwischen den Aktionspotentialen und den gemessenen Fluoreszenzsignalen auf den Grund zu gehen, konzipierten wir eine neue Klasse von Algorithmen zum Nachweis von Aktionspotentialen. Zu diesem Zweck entwickelten wir die mathematischen Grundlagen für die Anpassung der beobachteten Fluoreszenzdaten an ein biophysikalisches Modell (Abbildung 3a). Anders als bei der *“Black-Box”*-Statistik ordnet dieses Modell jedem Parameter

indicator binding states, fluorescence shot noise, variable indicator concentration across neurons, drifting baseline fluorescence and multiple noise sources. Unlike “black-box” statistical methods, this biophysical modeling approach assigns a physical interpretation to each parameter, so it was possible to clearly separate parameters shared across all neurons (such as rate constants for calcium binding) and those that vary across neurons (such as indicator concentration). This allowed us to greatly reduce the number of unknown variables per neuron, which leads to considerable improvements in both accuracy and speed. To detect spikes using these nonlinear biophysical models, we employed sequential Monte Carlo methods in a Bayesian state-space framework, which provide uncertainty estimates for the inferred spike trains and neuron parameters, facilitating automatic rejection of data for which accurate action potential detection cannot be performed. We tested our algorithm using combined optical and electrical recordings of mouse cortical neurons expressing GCaMP6s in vivo (Figure 3b). We also developed an efficient parallel implementation of our AP detection algorithm for rapid data processing on graphical processing units. Model-based AP detection allows a very accurate quantitative estimation of spike counts from the fluorescence signals arising from protein-based indicators.

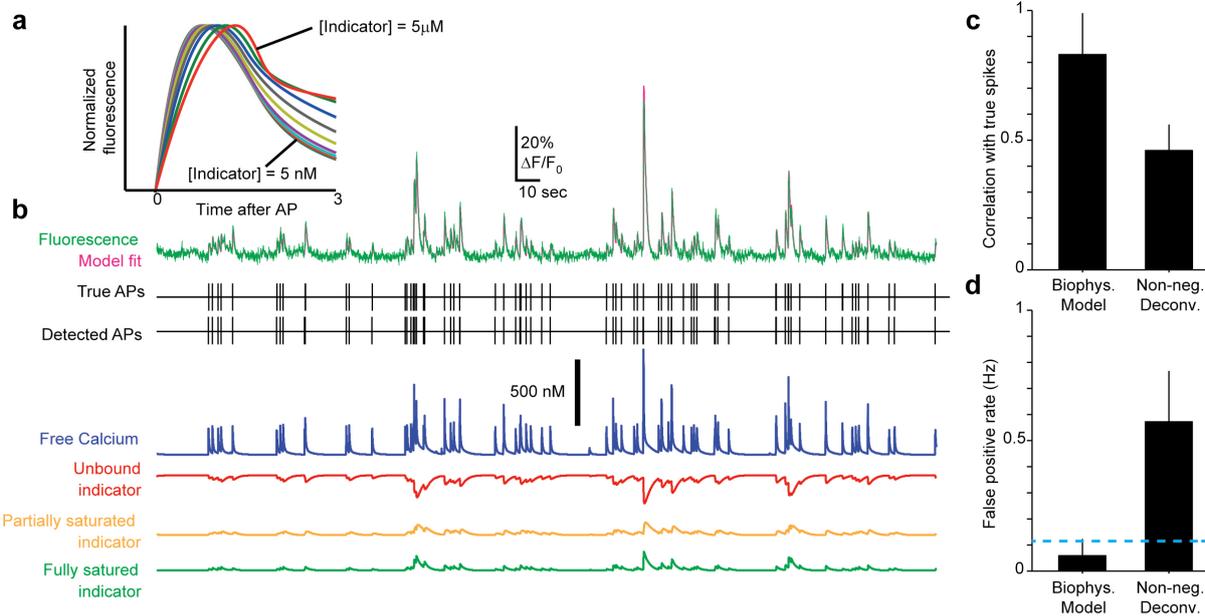


Figure 3: Detecting action potentials using a biophysical model of Ca^{2+} binding kinetics and fluorescence. **a.** time course of modeled fluorescence response to a single action potential (AP) for indicator concentrations of 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, and 5000 nM. **b.** comparison of model output and recorded data for one example neuron with simultaneous Ca^{2+} -imaging and electrophysiological recording. Upper section, top, recorded fluorescence data (green) overlaid on modelled Ca^{2+} -kinetic trace (pink), middle, times of electrophysiologically recorded action potentials, bottom, times of action potentials detected using the biophysical model. Lower section, individual components of biophysical model. **c.** comparison of the correlation between electrophysiologically recorded APs and APs detected by the biophysical model and by another commonly used AP detection method (non-negative deconvolution, Vogelstein *et al.*, *J. Neurophysiol.* (2010) 104:3691-3704). Data from 15 neurons in 6 animals, biophysical model and non-negative deconvolution run on same data. **d.** comparison of false positive detection rate for the biophysical model and non-negative deconvolution methods. Blue dashed line indicates mean firing rate from electrophysiology. Data as for c.

eine physikalische Interpretation zu. Auf diese Weise konnten wir die Parameter, die allen Neuronen gemeinsam sind (z.B. Geschwindigkeitskonstanten für die Kalziumbindung), von solchen Parametern trennen, die zwischen den Neuronen variieren (z.B. Indikatorkonzentration). So war es uns möglich, die Anzahl der unbekannt Variablen pro Neuron stark zu reduzieren und damit Genauigkeit und Geschwindigkeit erheblich zu verbessern. Um die Aktionspotentiale zu erfassen, wandten wir sequentielle Monte-Carlo-Methoden im Rahmen eines Zustandsraummodells nach Bayes an. Diese liefern Unsicherheitsschätzungen für die neuronalen Parameter und erleichtern so die automatische Zurückweisung von Daten, für die kein korrektes Aktionspotential detektiert werden kann. Wir testeten unseren Algorithmus *in vivo* an kortikalen Neuronen von Mäusen (Abbildung 3b). Zur schnellen Datenverarbeitung haben wir den Algorithmus parallel auf Grafikprozessoren implementiert. Mit unserem modellbasierten Ansatz können wir die Anzahl der Aktionspotentiale nun auch bei Kalziumindikatoren auf Proteinbasis präzise messen.

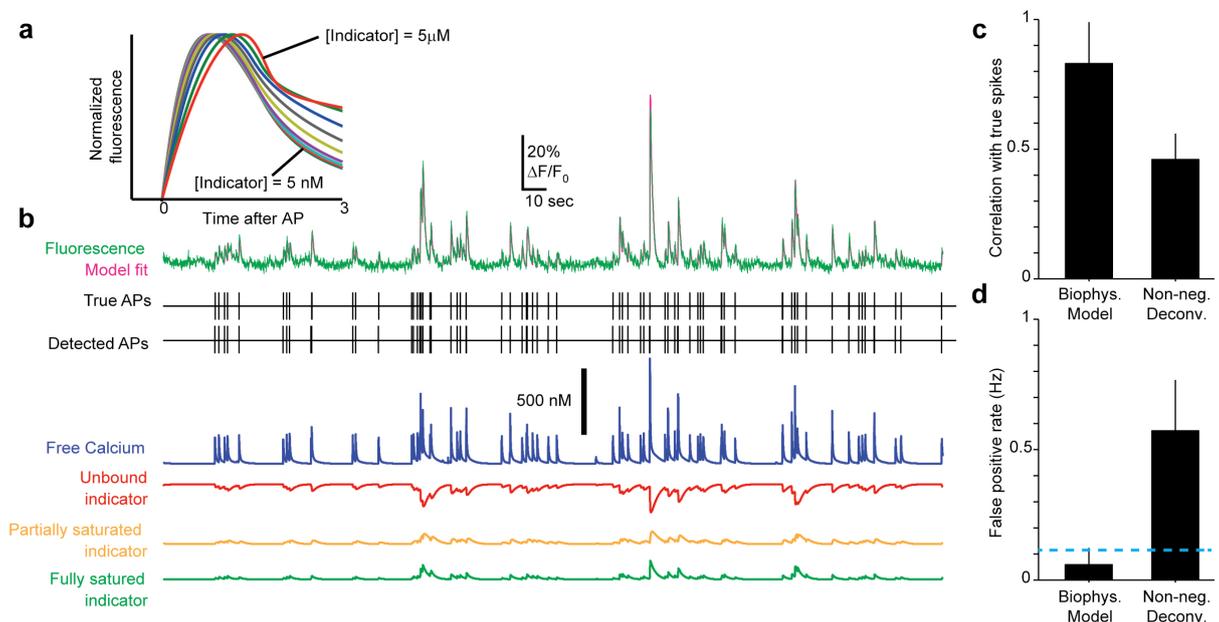


Abbildung 3. Erfassung von Aktionspotentialen mit einem biophysikalischen Modells (Ca²⁺-Bindungskinetik und Fluoreszenz).
a. Zeitlicher Verlauf der Fluoreszenzreaktion auf ein einzelnes Aktionspotential bei Indikatorkonzentrationen von 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500 und 5000 nM. **b.** Vergleich der im Modell ausgesendeten Signale mit den Messdaten für ein exemplarisches Neuron mittels gleichzeitiger Ca²⁺-Bildgebung und elektrophysiologischer Messung. Oberer Abschnitt, oben: Überlagerung der Ca²⁺-kinetischen Spur (rosa) des Modells mit den Fluoreszenzmessdaten (grün); Mitte: zeitlicher Verlauf der elektrophysiologisch aufgezeichneten Aktionspotentiale; unten: zeitlicher Verlauf der mittels des biophysikalischen Modells erfassten Aktionspotentiale. Unterer Abschnitt: Einzelkomponenten des biophysikalischen Modells. **c.** Vergleich der Korrelation zwischen den elektrophysiologisch gemessenen Aktionspotentialen und Aktionspotentialen, die mittels des biophysikalischen Modells und eines anderen häufig eingesetzten Detektionsverfahrens (nicht-negative Dekonvolution, Volgelstein *et al.*, *J. Neurophysiol.* (2010) 104:3691-3704) erfasst wurden. Biophysikalisches Modell und nicht-negative Dekonvolution arbeiten mit jeweils denselben Daten von 15 Neuronen aus 6 Tieren. **d.** Vergleich der falsch-positiven Erfassungsrate im biophysikalischen Modell bzw. in nicht-negativen Dekonvolutionsverfahren. Die blau gestrichelte Linie stellt die in der Elektrophysiologie gemessene mittlere Impulsfrequenz dar. Daten wie in c.

Extraction of Overlapping Fluorescent Features Validated by Ground Truth Data

Kay Voit, Damian J. Wallace, Jason N. D. Kerr, and David S. Greenberg

Protein-based calcium sensors such as GCaMPs allow imaging of neuronal activity *in vivo* less invasively and for much greater durations than synthetic indicators. But while synthetic indicators stain entire neuronal somata against a uniform background, protein-based sensors stain only a thin band of cytosol against a sparsely stained background of fine dendritic structures. These dendrites can be extremely bright and often overlap with cytosolic staining, and both neurons and dendrites can disappear when not spiking. Because of the large changes in fluorescence emission during spiking activity, inclusion of even a small fraction of dendrite in the soma of another neuron can introduce spurious fluorescence increases comparable to those from small numbers of action potentials (Figure 4 a,c). We therefore developed algorithms to accurately separate signals from neurons, dendrites, and diffuse

Contact

Kay Voit

Research Center caesar

Department of Behavior

and Brain Organization

Phone: +49 (0)228 9656-310

Kay-Michael.Voit@caesar.de

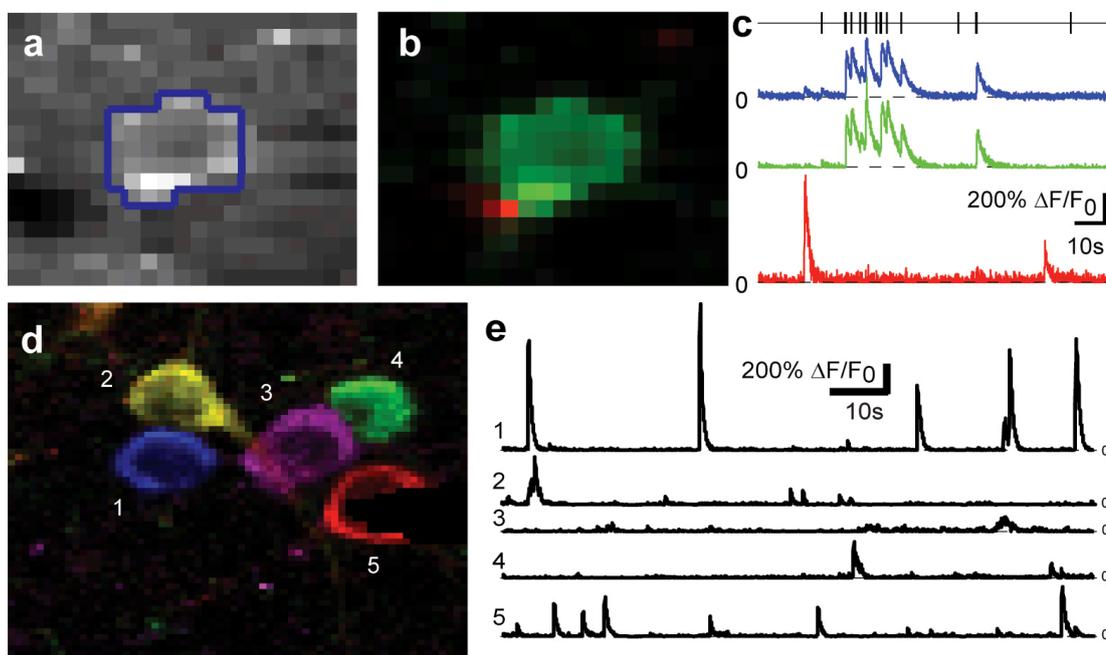


Figure 4: Extraction of overlapping features in functional multiphoton data. a. enlarged view of raw data of a single neuron with simultaneous Ca^{2+} -imaging and electrophysiological data. Hand drawn region of interest (roi) blue. b. same as a but after feature extraction. Individual features detected shown red and green. c. kinetic traces from data in a and b, blue from hand drawn roi, red and green from extracted features. Top, electrophysiologically recorded action potentials. d. feature extraction from population. e. kinetic data from features identified in d.

Trennung von sich überlappenden Fluoreszenzsignalen

Kay Voit, Damian J. Wallace, Jason N. D. Kerr und David S. Greenberg

Kontakt

Kay Voit

Forschungszentrum caesar

Abteilung Organisation des

Gehirns und Verhaltens

Telefon: +49 (0)228 9656-310

Kay-Michael.Voit@caesar.de

Mit Kalziumsensoren auf Proteinbasis kann man die neuronale Aktivität *in vivo* auf weniger invasive Weise und über wesentlich längere Zeiträume abbilden als mit synthetischen Indikatoren. Synthetische Indikatoren färben das gesamte Soma der Neuronen vor einem einfarbigen Hintergrund an. Bei proteinbasierten Sensoren wird lediglich ein dünnes Zytosolband vor einem leicht farbigen Hintergrund aus feinen dendritischen Strukturen angefärbt. Diese Dendriten können sehr hell sein und überdecken häufig die Zytosolfärbung. Bei der Interpretation der Signale ist somit Vorsicht angebracht: Der Einschluss selbst eines kleinen Teils eines Dendriten in das Soma eines anderen Neurons kann zu einer scheinbaren Zunahme der Fluoreszenz führen (Abbildung 4 a,c), vergleichbar mit der durch eine geringe Anzahl von Aktionspotentialen ausgelösten Fluoreszenz. Wir haben daher Algorithmen zur präzisen

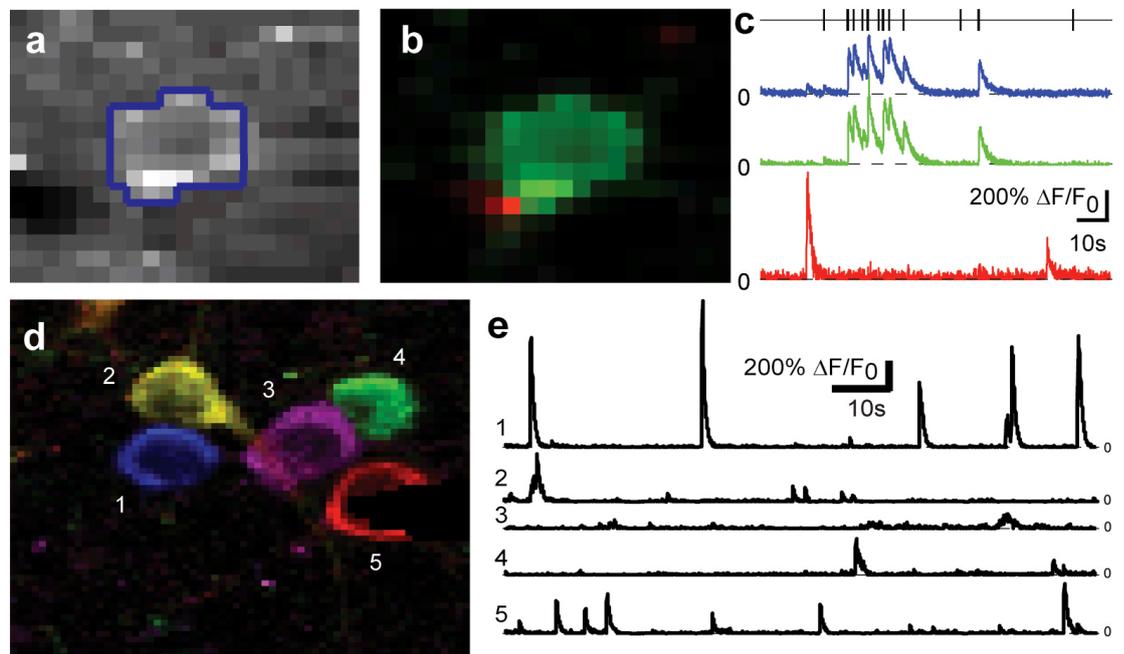


Abbildung 1: Extraktion sich überlagernder Merkmale funktionaler Multiphotonen-Bildgebungsdaten. a. Vergrößerte Ansicht der Rohdaten eines einzelnen Neurons bei gleichzeitiger Ca^{2+} -Bildgebung und Elektrophysiologie. Von Hand eingezeichneter „Bereich von Interesse“ (*region of interest, roi*): blau. b. Wie in a, jedoch nach Merkmalsextraktion. Erfasste Einzelmerkmale sind rot und grün dargestellt. c. Kinetische Daten aus a und b; blau: von Hand eingezeichneter Bereich von Interesse, rot und grün: aus extrahierten Merkmalen. Oben: elektrophysiologisch gemessene Aktionspotentiale. d. Merkmalsextraktion aus der Population. e. Kinetische Daten aus den in d identifizierten Merkmalen.

background fluorescence, even when these structures overlap in space or their fluorescence signals are correlated in time (Figure 2b,c). We developed a novel form of non-negative matrix factorization (NMF) that automatically limits the total number of fluorescent structures and the extent of their overlap, while incorporating prior knowledge about the calcium sensor's properties to impose mild constraints on each structure's fluorescence changes over time. To validate this method we compared fluorescence signals extracted from mouse cortical neurons expressing the protein-based fluorescent calcium indicator GCaMP6s to electrically recorded action potentials (Figure 2c). Feature extraction improved the match between optical and electrical signals, as compared to fluorescence averaged across hand-drawn regions of interest or previous feature extraction methods based on ICA, PCA or NMF. This new extraction method improved AP detection accuracy, in particular by reducing the rate of false positives. In many cases, feature extraction revealed fluorescently labeled structures or even entire neurons that were not visible in time-averaged fluorescence images.



Trennung der Signale von Neuronen, Dendriten und diffuser Hintergrundfluoreszenz entwickelt, die auch bei räumlicher Überlagerung und zeitlicher Korrelation der Signale wirkt (Abbildung 2b, c). Ein neues Verfahren, basierend auf nicht-negativer Matrixfaktorisierung (*non-negative matrix factorization*, NMF) begrenzt automatisch die Gesamtzahl fluoreszierender Strukturen sowie den Grad ihrer Überlagerung und berücksichtigt gleichzeitig Vorkenntnisse über Eigenschaften des Kalziumensors. Zur Validierung dieses Verfahrens verglichen wir die Fluoreszenzsignale, die aus den kortikalen Mausneuronen extrahiert wurden, mit den elektrisch gemessenen Aktionspotentialen (Abbildung 2c). Durch das neue Verfahren konnten die Aktionspotentiale sehr viel genauer detektiert werden, indem die Falsch-Positiv-Rate verringert wurde. In vielen Fällen kamen fluoreszierend markierte Strukturen oder sogar ganze Neuronen zum Vorschein, die zuvor nicht sichtbar waren.

Accessing deeper brain structures using light

Alexandr Klioutchnikov, Jürgen Sawinski, and Jason N. D. Kerr

Since measurement of neuronal activity through fluorescent sensor molecules depends on delivering excitation light and recovering fluorescence from the neurons of interest, the maximum depth of the recorded neurons is limited by the scattering and absorption of light by brain tissue. We recently showed that the maximum imaging depth in the intact cortex can be significantly extended using regenerative amplifier multiphoton microscopy (RAMM; [6]). The full potential of this technique, however, has not yet been reached due to limited signal-to-background ratio (SBR)

Contact

Alexandr Klioutchnikov
 Research Center caesar
 Department of Behavior
 and Brain Organization
 Phone: +49 (0)228 9656-317
 alexandr.klioutchnikov@caesar.de

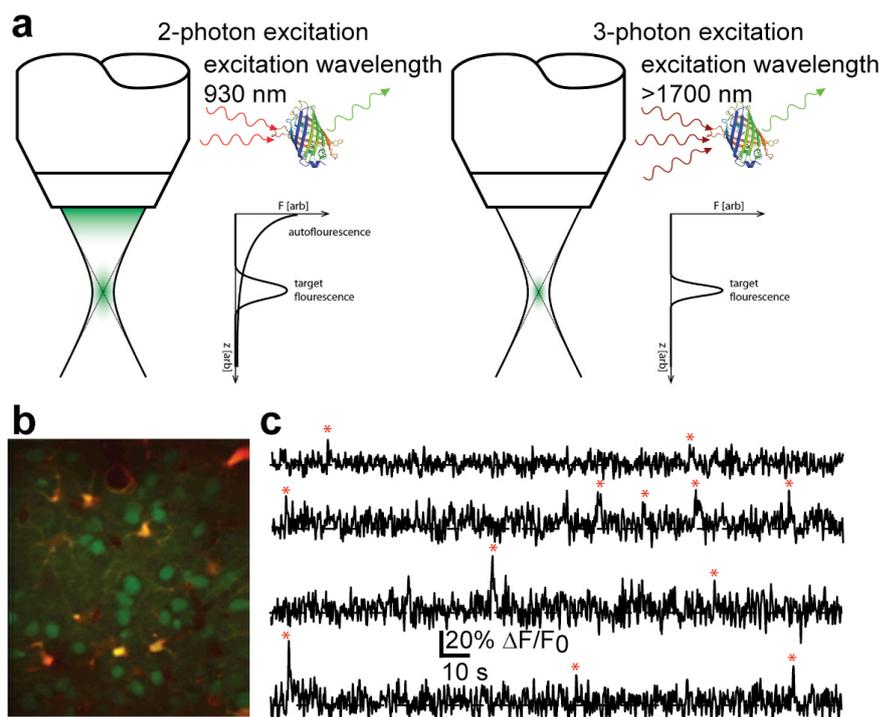


Figure 5: Functional multiphoton imaging of activity in cortical neurons using 3-photon excitation. a. schematic illustration of principal differences between 2-photon excitation (left) and 3-photon excitation (right), note autofluorescence decrease with 3P. b. overview image of a population of neurons labelled with Oregon Green BAPTA-1 (OGB-1). Green fluorescence from OGB-1 was excited using 3-photon excitation, while red fluorescence from sulforhodamine-101 labelling of astrocytes was excited by 2-photon excitation. c. example Ca^{2+} kinetics from neurons in the population shown in b. Putative action potential-associated transients denotes by red stars.

Zugang zu tiefer liegenden Hirnstrukturen mittels Licht

Alexandr Klioutchnikov, Jürgen Sawinski und Jason N. D. Kerr

Kontakt

Alexandr Klioutchnikov
Forschungszentrum caesar
Abteilung Organisation des
Gehirns und Verhaltens
Telefon: +49 (0)228 9656-317
alexandr.klioutchnikov@caesar.de

Um die neuronale Aktivität mit fluoreszierenden Sensormolekülen zu messen, wird Licht zur Anregung benötigt. Lichtstreuung und -absorption durch das Hirngewebe begrenzen die maximale Abbildungstiefe. Wir konnten kürzlich zeigen, dass die maximale Abbildungstiefe im intakten Kortex durch Einsatz eines Multiphotonenmikroskops mit regenerativem Verstärker (RAMM; [6]) erheblich gesteigert werden kann. Das vollständige Potenzial dieser Technik wurde jedoch aufgrund des eingeschränkten Signal-Rausch-Verhältnisses bislang noch nicht ausgereizt [8].

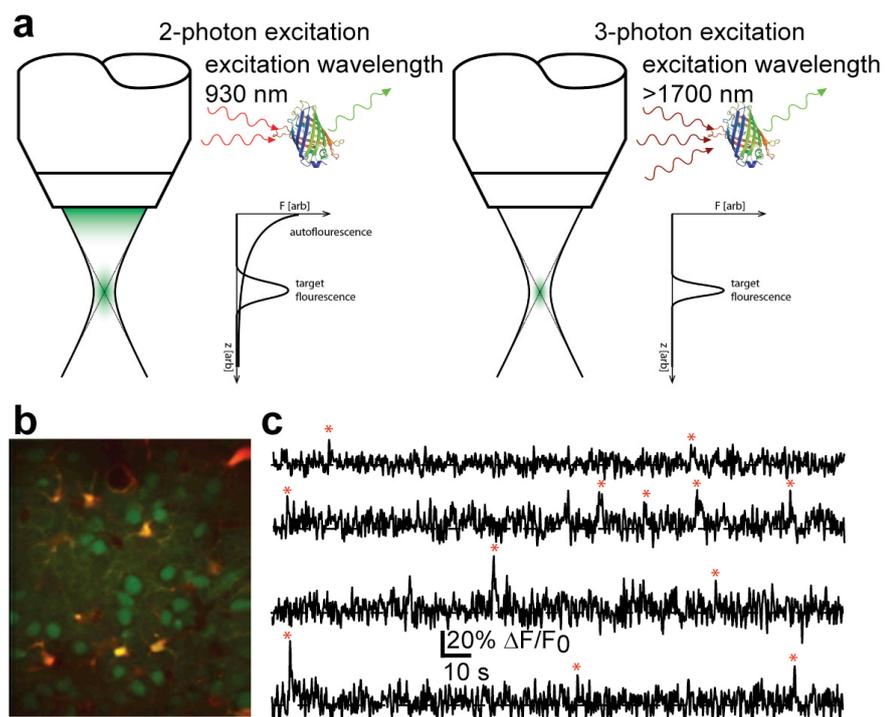


Abbildung 5: Darstellung der Aktivität kortikaler Neuronen mittels funktionaler Multiphotonen-Bildgebung (3-Photonen-Anregung). a. Schematische Darstellung der grundlegenden Unterschiede zwischen 2-Photonen-Anregung (links) und 3-Photonen-Anregung (rechts), Anmerkung: Abnahme der Autofluoreszenz bei 3P. b. Übersichtsbild einer mit Oregon Green BAPTA-1 (OGB-1) markierten neuronalen Population. Die grüne Fluoreszenz aus OGB-1 wurde mittels 3P angeregt, die rote Fluoreszenz aus der Sulforhodamin-101-Markierung von Astrozyten durch 2P. c. Beispiel: Ca^{2+} -Kinetik von Neuronen der in b dargestellten Population.

[8]. Imaging neuronal activity *in vivo* requires sufficient temporal resolution to reliably detect the transient calcium influx associated with neuronal activity, so a sufficiently high SBR must be obtained in individual images without averaging.

To extend the maximum depth at which neuronal activity can be imaged, we therefore sought to increase SBR, in two complementary ways. First, longer wavelength excitation light should theoretically penetrate deeper into light scattering tissue and thereby increase maximum imaging depth. Additionally, switching from two- to three-photon excitation should increase SBR by several orders of magnitude as background fluorescence should drop off more quickly with distance from the imaging target (Figure 3a). To test whether these approaches could be used to improve the depth limit for imaging neuronal activity, we equipped the original RAMM setup [6;9] with an optical parametric amplifier (OPA) that can generate a broad range of wavelength extending to 1700 nm. We record fluorescence signals from populations of layer 2/3 cortical neurons labelled with Oregon Green BAPTA I-AM (Figure 3b), using 2-photon excitation in the red channel and 3-photon excitation in the green channel of the microscope. These initial experiments show that 3-photon excitation can be used to measure action potential-evoked fluorescence signals *in vivo* while the tissue remains intact and undamaged (Figure 3c). We are currently customizing the optical pathway for greater transmission at longer wavelengths and envisage including adaptive optics for higher resolution of the deeper structures.



Die bildgebende Darstellung der neuronalen Aktivität *in vivo* erfordert für den zuverlässigen Nachweis des Kalziumeinstroms eine ausreichende zeitliche Auflösung. Daher muss in Einzelbildern ohne Mittelwertbildung ein ausreichend hohes Signal-Rausch-Verhältnis erzielt werden.

Zur Steigerung der maximalen Tiefe, mit der sich die neuronale Aktivität abbilden lässt, versuchten wir daher das Signal-Rausch-Verhältnis auf zweierlei Art und Weise zu erhöhen: Zunächst einmal sollte Anregungslicht einer längeren Wellenlänge theoretisch tiefer in das Licht streuende Gewebe eindringen und die maximale Abbildungstiefe so zunehmen. Darüber hinaus sollte das Signal-Rausch-Verhältnis durch den Wechsel von einer 2- auf eine 3-Photonen-Anregung um mehrere Größenordnungen steigen, da die Hintergrundfluoreszenz mit zunehmender Entfernung immer schneller abnimmt (Abbildung 3a). Um zu testen, wie wirksam diese Ansätze sind, rüsteten wir das Original-RAMM-Mikroskop [6;9] mit einem optisch-parametrischen Verstärker aus, der eine große Bandbreite an Wellenlängen bis über 1700 nm erzeugen kann. Wir maßen nun die Fluoreszenzsignale aus Populationen mit markierten kortikalen Neuronen aus Schicht 2/3 (Abbildung 3b) mittels 2-Photonen-Anregung im roten Kanal und 3-Photonen-Anregung im grünen Kanal des Mikroskops. Diese ersten Experimente zeigen, dass das Gewebe bei der Messung *in vivo* mittels 3-Photonen-Anregung intakt und unbeschädigt bleibt (Abbildung 3c). Aktuell bemühen wir uns um größere Transmission bei längeren Wellenlängen und bereiten den Einbau einer adaptiven Optik für eine höhere Auflösung der tiefer liegenden Strukturen vor.

References

- [1] Denk, W., Strickler, J. H. & Webb, W. W. (1990) "Two-photon laser scanning fluorescence microscopy" *Science* 248, 73-76
- [2] Greenberg, D. S., Houweling, A. R. & J. N. Kerr, J. N. (2008) "Population imaging of ongoing neuronal activity in the visual cortex of awake rats" *Nat. Neurosci.* 11, 749-751
- [3] Kerr, J. N., de Kock, C. P., Greenberg, D. S., Bruno, R. M., Sakmann, B. & Helmchen, F. (2007) "Spatial organization of neuronal population responses in layer 2/3 of rat barrel cortex" *J. Neurosci.* 27, 13316-13328
- [4] Kerr, J. N. & Denk, W. (2008) "Imaging in vivo: watching the brain in action" *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 195-205
- [5] Kerr, J. N., Greenberg, D. & Helmchen, F. (2005) "Imaging input and output of neocortical networks in vivo" *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 14063-14068
- [6] Mittmann, W., Wallace, D. J., Czubayko, U., Herb, J. T., Schaefer, A. T., Looger, L. L., et al. (2011) "Two-photon calcium imaging of evoked activity from L5 somatosensory neurons in vivo" *Nat. Neurosci.* 14, 1089-1093
- [7] Sawinski, J., Wallace, D. J., Greenberg, D. S., Grossmann, S., Denk, W. & J. N. Kerr, J. N. (2009) "Visually evoked activity in cortical cells imaged in freely moving animals" *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 19557-19562
- [8] Theer, P. & Denk, W. (2006) "On the fundamental imaging-depth limit in two-photon microscopy" *J. Opt. Soc. Am. A. Opt. Image. Sci. Vis.* 23, 3139-3149
- [9] Theer, P., Hasan, M. T. & Denk, W. (2003) "Two-photon imaging to a depth of 1000 microm in living brains by use of a Ti:Al₂O₃ regenerative amplifier" *Opt. Lett.* 28, 1022-1024
- [10] Tian, L., S. Hires, A., Mao, T., Huber, D., Chiappe, M. E., Chalasani, S. H. et al. (2009) "Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved GCaMP calcium indicators" *Nat. Methods* 6, 875-881
- [11] Wallace, D. J., Greenberg, D. S., Sawinski, J., Rulla, S., Notaro, G. & Kerr, J. N. (2013) "Rats maintain an overhead binocular field at the expense of constant fusion" *Nature* 498, 65-69
- [12] Wallace, D. J. & J. N. Kerr, J. N. (2010) "Chasing the cell assembly" *Curr. Opin. Neurobiol.* 20, 296-305
- [13] Wallace, D. J., Meyer zum Alten Borgloh, S., Astori, S., Yang, Y., Bausen, M., Kugler, S., et al. (2008) "Single-spike detection in vitro and in vivo with a genetic Ca²⁺ sensor" *Nat. Methods* 5, 797-804



Literatur

- [1] Denk, W., Strickler, J. H. & Webb, W. W. (1990) "Two-photon laser scanning fluorescence microscopy" *Science* 248, 73-76
- [2] Greenberg, D. S., Houweling, A. R. & J. N. Kerr, J. N. (2008) "Population imaging of ongoing neuronal activity in the visual cortex of awake rats" *Nat. Neurosci.* 11, 749-751
- [3] Kerr, J. N., de Kock, C. P., Greenberg, D. S., Bruno, R. M., Sakmann, B. & Helmchen, F. (2007) "Spatial organization of neuronal population responses in layer 2/3 of rat barrel cortex" *J. Neurosci.* 27, 13316-13328
- [4] Kerr, J. N. & Denk, W. (2008) "Imaging in vivo: watching the brain in action" *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 195-205
- [5] Kerr, J. N., Greenberg, D. & Helmchen, F. (2005) "Imaging input and output of neocortical networks in vivo" *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 14063-14068
- [6] Mittmann, W., Wallace, D. J., Czubayko, U., Herb, J. T., Schaefer, A. T., Looger, L. L., et al. (2011) "Two-photon calcium imaging of evoked activity from L5 somatosensory neurons in vivo" *Nat. Neurosci.* 14, 1089-1093
- [7] Sawinski, J., Wallace, D. J., Greenberg, D. S., Grossmann, S., Denk, W. & J. N. Kerr, J. N. (2009) "Visually evoked activity in cortical cells imaged in freely moving animals" *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 19557-19562
- [8] Theer, P. & Denk, W. (2006) "On the fundamental imaging-depth limit in two-photon microscopy" *J. Opt. Soc. Am. A. Opt. Image. Sci. Vis.* 23, 3139-3149
- [9] Theer, P., Hasan, M. T. & Denk, W. (2003) "Two-photon imaging to a depth of 1000 microm in living brains by use of a Ti:Al₂O₃ regenerative amplifier" *Opt. Lett.* 28, 1022-1024
- [10] Tian, L., S. Hires, A., Mao, T., Huber, D., Chiappe, M. E., Chalasani, S. H. et al. (2009) "Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved GCaMP calcium indicators" *Nat. Methods* 6, 875-881
- [11] Wallace, D. J., Greenberg, D. S., Sawinski, J., Rulla, S., Notaro, G. & Kerr, J. N. (2013) "Rats maintain an overhead binocular field at the expense of constant fusion" *Nature* 498, 65-69
- [12] Wallace, D. J. & J. N. Kerr, J. N. (2010) "Chasing the cell assembly" *Curr. Opin. Neurobiol.* 20, 296-305
- [13] Wallace, D. J., Meyer zum Alten Borgloh, S., Astori, S., Yang, Y., Bausen, M., Kugler, S., et al. (2008) "Single-spike detection in vitro and in vivo with a genetic Ca²⁺ sensor" *Nat. Methods* 5, 797-804

Preservatives, pesticides, UV blockers... How everyday chemicals impair human sperm function

Christian Schiffer, Astrid Müller, Timo Strünker

Caesar has created global headlines with this study: Endocrine disrupting chemicals impair human sperm function and might be involved in fertility disorders seen with increasing frequency in the Western world.

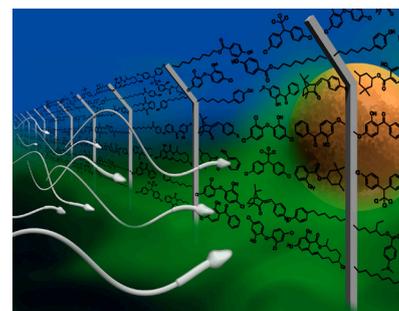
For some time now, it has been observed with concern that an increasing number of couples who are trying to produce a baby require medical help from reproductive clinics. The causes of this are complex. It is suspected that disorders of the hormonal (also known as endocrine) system play a role. The endocrine system keeps our organism in equilibrium: prominent examples include blood sugar level regulation by the hormones insulin and glucagon, as well as the coordination of puberty by testosterone and the estrogens.

Sperm are also controlled by hormones: Progesterone – a female sex hormone released by cells surrounding the egg – acts on the so-called CatSper (Cation channel of Sperm) calcium channels in the membrane of the sperm's tail - the flagellum. Progesterone opens CatSper, evoking an influx of calcium into the sperm. This calcium increase changes the swimming behavior. It has been proposed that sperm follow the progesterone trail in the oviduct to find their way to the egg: in other words, progesterone could serve as an attractant for human sperm. In addition to its attracting effect, progesterone serves other functions. In the vicinity of the egg, it triggers sperm "hyperactivation". Hyperactive sperm beat their tails wildly: the hormone puts the sperm into "turbo mode". This helps them to penetrate the protective egg vestments. In addition, progesterone evokes the acrosome reaction, in which a cocktail of digestive enzymes is released from a vesicle in the spermheads, rendering the egg vestments easier to penetrate.

In our daily lives, we are exposed to numerous chemicals that can influence the hormonal system. These chemicals are referred to as endocrine disrupting chemicals (EDCs). They are omnipresent in foods, plastics, textiles, household products, cosmetics, and toys. It has long been suspected that EDCs interfere with our sex hormone system and have an adverse effect on both unborn babies and on children undergoing puberty. In addition, EDCs seem to impair male fertility, for example by promoting testicular cancer, retaining of testicles, and impairing sperm production. The harmful effect of these chemicals on humans and human fertility has been difficult to prove, because few suitable test systems exist.

Contact

Timo Strünker
Research Center caesar
Department of
Molecular Sensory Systems
Phone: +49 (0)228 9656-162
timo.struenker@caesar.de



Konservierungsstoffe, Pestizide, UV-Blocker und Co.: Wie Alltagschemikalien die Spermienfunktion beeinträchtigen

Christian Schiffer, Astrid Müller, Timo Strünker

Kontakt

Timo Strünker

Forschungszentrum caesar
Abteilung

Molekulare Neurosensorik

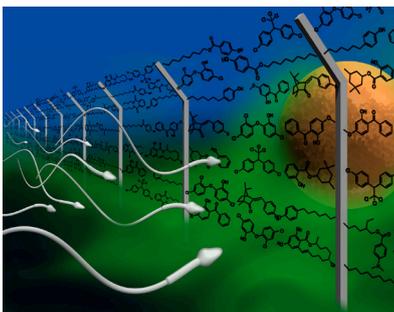
Telefon: +49 (0)228 9656-162

timo.struenker@caesar.de

Mit dieser Studie hat caesar weltweit für Schlagzeilen gesorgt: Hormonell wirksame Chemikalien (*endocrine disrupting chemicals*) beeinträchtigen die Funktion menschlicher Spermien und könnten mitverantwortlich sein für Fruchtbarkeitsstörungen, die in der westlichen Welt immer häufiger auftreten.

Seit langem beobachtet man mit Sorge, dass immer mehr Paare auf reproduktionsmedizinische Unterstützung angewiesen sind, um sich ihren Kinderwunsch zu erfüllen. Die Ursachen sind vielschichtig. Es wird vermutet, dass Störungen des Hormonsystems eine Rolle spielen. Das Hormonsystem hält unseren Organismus im Gleichgewicht: Prominente Beispiele sind die Regulation des Blutzuckerspiegels durch die Hormone Insulin und Glucagon sowie die Koordination der Pubertät durch Testosteron bzw. Östrogene.

Auch Spermien sind hormongesteuert: Progesteron – ein Sexualhormon, das die Eizelle in den Eileiter ausschüttet – wirkt auf die sogenannten CatSper (*cation channel of sperm*) Kalzium-Kanäle in der Membran des Spermenschwanzes, des sogenannten Flagellums. Progesteron öffnet die CatSper-Kanäle, so dass Kalzium in das Spermium einströmt. Der Kalzium-Anstieg ändert das Schwimmverhalten der Spermien. Die Spermien folgen vielleicht der Progesteronfährte und finden so zur Eizelle: Progesteron könnte also menschliche Spermien anlocken. Neben dieser „anziehenden“ Wirkung hat Progesteron noch weitere Funktionen. In unmittelbarer Nähe zur Eizelle löst es eine „Hyperaktivierung“ der Spermien aus. Hyperaktive Spermien schlagen wild mit ihrem Schwanz; das Hormon schaltet bei den Spermien „den Turbo ein“. Das hilft den Spermien, die schützende Eihülle zu durchdringen. Zudem löst Progesteron die Akrosomreaktion bei den Spermien aus. Dabei setzen die Spermien aus einem Bläschen in ihrem Kopf einen enzymatischen Verdauungscocktail frei, der die Eihülle durchlässiger macht.



In unserem Alltag sind wir vielen Chemikalien ausgesetzt, die das Hormonsystem beeinflussen können. Solche Chemikalien nennt man *endocrine disrupting chemicals* (EDCs) – Störer des Hormonsystems. Sie sind allgegenwärtig in Lebensmitteln, Plastik, Textilien, Haushaltsprodukten, Kosmetika und Spielzeug. Man vermutet schon lange, dass diese Alltagschemikalien in unser Sexualhormonsystem eingreifen und die Entwicklung von Kindern im Mutterleib und in der Pubertät beeinträchtigen. Zudem scheinen EDCs die männliche Fruchtbarkeit zu beeinträchtigen, indem sie zum Beispiel die Entstehung von Hodenkrebs und Hodenhochstand fördern und die Spermienproduktion

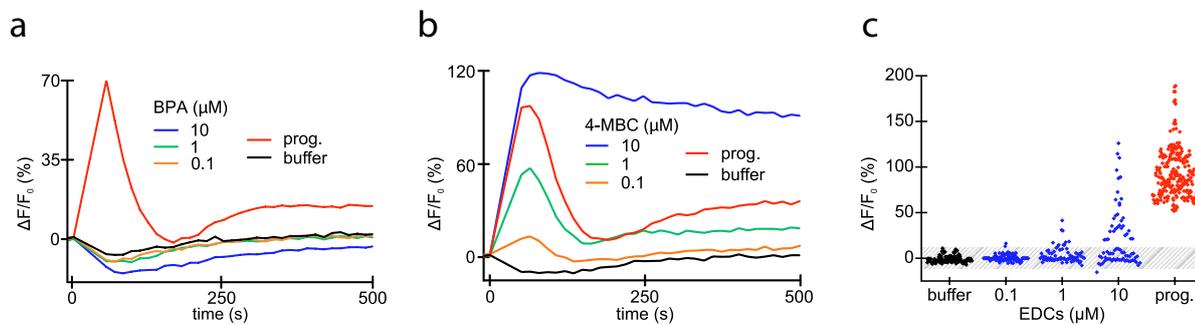


Figure 1: Do EDCs trigger calcium responses in sperm? A calcium-indicator dye was introduced into sperm to monitor changes in their intracellular calcium concentration. Once inside the sperm, the dye emits fluorescence light. The intensity of the fluorescence depends on the calcium concentration. A fluorescence increase indicates an increase in calcium. **a.** Bisphenol A (BPA), unlike progesterone (= 2 μM), does not trigger a calcium response. **b.** 4-Methylbenzylidene camphor (4-MBC) triggers calcium responses at 10, 1 and 0.1 μM . The amplitude of the calcium response at 10 μM 4-MBC is similar to calcium responses evoked by progesterone. **c.** Analysis of screening trials of about 100 EDCs. The points on the graph represent the mean signal amplitudes of the calcium responses following addition of the EDCs at concentrations of 0.1, 1 and 10 μM (blue) compared to progesterone (2 μM ; red) and a buffer solution (black). Addition of buffer acts as a negative control: Any EDCs that trigger calcium responses greater than those seen with the buffer (i.e., those in which the fluorescence intensity lies above the gray-hatched area) are defined as “active”.

We wondered whether EDCs interfere with the hormonal regulation of sperm, and, thereby, with the “chemistry of fertilization”. To this end, we tested around 100 of the most widespread EDCs for their action on intracellular calcium levels in human sperm [1]. Many chemicals, such as the plasticizer bisphenol A, did not affect calcium levels (Figure 1a); however, about one-third of the tested EDCs, for example 4-methylbenzylidene camphor (4-MBC), a UV blocker used in cosmetics, did trigger calcium responses. The calcium responses resembled those evoked by progesterone (Figure 1b) – a truly alarming result.

The “active” chemicals, in addition to 4-MBC, included other UV blockers such as homosalate, benzophenone-3 and padimate O, as well as the plasticizer di-n-butyl phthalate, the pesticide DDT, a growth promoter used to fatten farm animals (α -zearalenol), plus the substances triclosan and n-nonylparaben, which are found in various cosmetics. We characterized the mechanism of action of a selection of active, chemically diverse EDCs (Figure 2).

First of all, we investigated whether EDCs – like progesterone – open CatSper and, thereby, evoke an influx of calcium. To this end, we measured the minute ionic currents flowing through CatSper channels, using the patch-clamp technique. In a patch-clamp experiment, a small glass electrode is attached to the sperm membrane – a bit like using a stethoscope in medicine – to monitor the opening

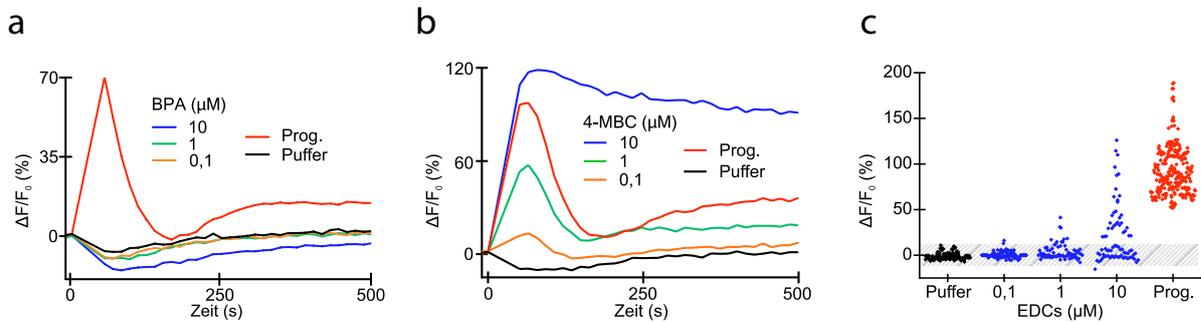


Abbildung 1: Lösen EDCs Kalzium-Antworten in Spermien aus? Um Änderungen der Kalzium-Konzentration in Spermien messen zu können, wurde ein Kalzium-Indikatorfarbstoff in die Spermien eingeschleust. Der Farbstoff wird in den Spermien zur Fluoreszenz angeregt. Steigt die Kalzium-Konzentration in den Spermien an, nimmt die Fluoreszenzintensität des Indikators zu. **a.** Bisphenol A (BPA) löst im Gegensatz zu Progesteron (= 2 μ M) keine Kalzium-Antworten aus. **b.** 4-Methylbenzylidenampher (4-MBC) löst Kalzium-Antworten bei 10, 1 und 0,1 μ M aus. Die Amplitude der Kalzium-Antwort bei 10 μ M 4-MBC ist mit der Kalzium-Antwort nach Zugabe von Progesteron vergleichbar. **c.** Auswertung des Screenings von etwa 100 EDCs. Aufgetragen sind die mittleren Signalamplituden der Kalzium-Antworten nach Zugabe der EDCs in Konzentrationen von 0,1, 1 und 10 μ M (blau) im Vergleich zu Progesteron (2 μ M; rot) und Pufferlösung (schwarz). Die Zugabe von Pufferlösung dient als Negativkontrolle: EDCs, die größere Kalzium-Antworten auslösen als die Pufferlösung (deren Fluoreszenzintensität also über dem grauschraffierten Bereich liegt), bezeichnen wir als „aktiv“.

drosseln. Die schädigende Wirkung dieser Chemikalien auf den Menschen und seine Fruchtbarkeit ließ sich bislang nur schwer nachweisen, da kaum geeignete Testsysteme existierten.

Wir haben uns gefragt, ob EDCs die hormonelle Kontrolle der Spermien und damit die Chemie der Befruchtung stören könnten. Dazu haben wir etwa 100 der am weitesten verbreiteten EDCs daraufhin untersucht, ob sie in den Kalzium-Haushalt menschlicher Spermien eingreifen [1]. Viele Chemikalien, zum Beispiel der Kunststoffweichmacher Bisphenol A, beeinflussten den Kalzium-Haushalt nicht (Abbildung 1a); etwa ein Drittel der getesteten EDCs, wie zum Beispiel 4-Methylbenzylidenampher (4-MBC), ein UV-Blocker in Kosmetika, lösten jedoch Kalzium-Antworten aus. Diese Kalzium-Antworten sahen so ähnlich aus wie nach der Zugabe von Progesteron (Abbildung 1b). Ein alarmierendes Ergebnis!

Unter den „aktiven“ Chemikalien waren neben 4-MBC auch andere UV-Blocker, zum Beispiel Homosalat, Benzophenon-3 und Padimat O, darüber hinaus der Kunststoff-Weichmacher Di-n-butylphthalat, das Pestizid DDT, ein Wachstumsbeschleuniger aus der Viehmast (α -Zearalenol) oder die antimikrobiell wirkenden Stoffe Triclosan und n-Nonylparaben, die in verschiedenen Kosmetika enthalten sind. Für eine Auswahl aktiver EDCs mit unterschiedlichen chemischen Strukturen (Abbildung 2) haben wir den Wirkungsmechanismus charakterisiert.

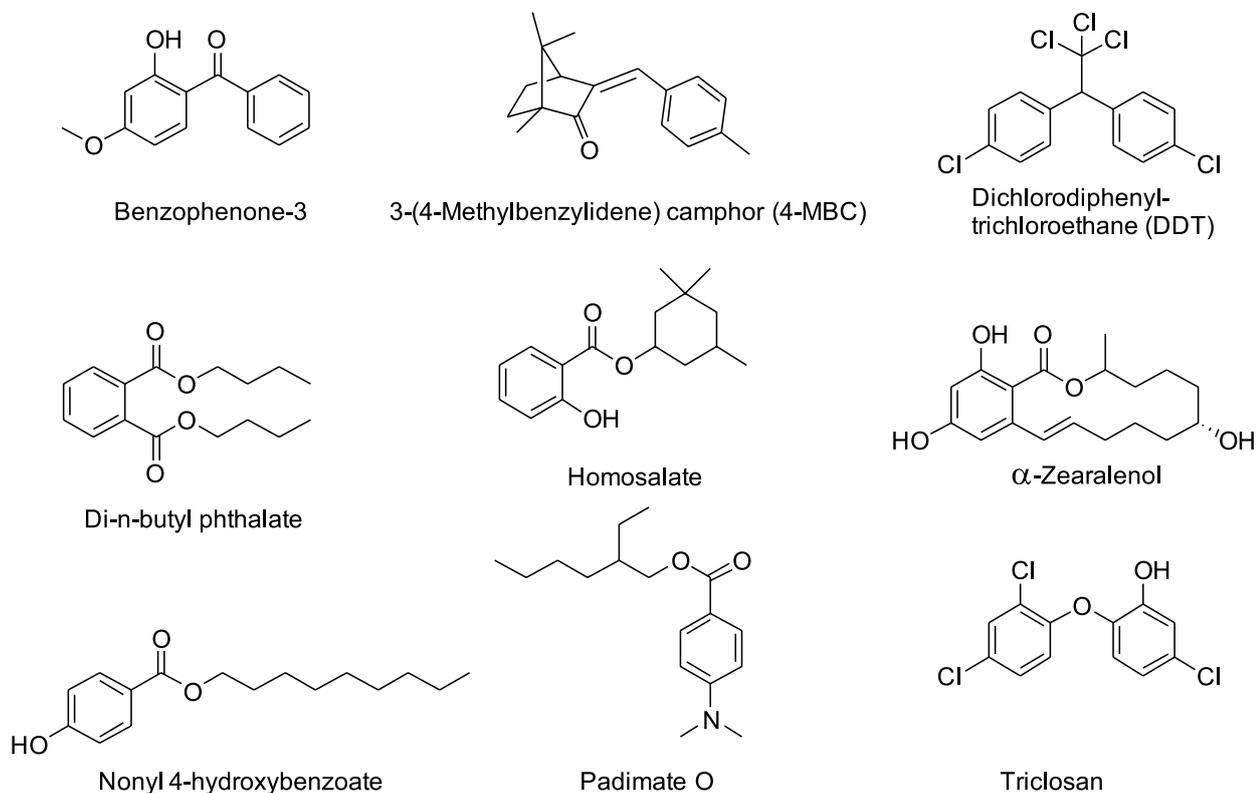


Figure 2: Chemical structures of EDCs that evoke calcium responses in human sperm.

and closing of the CatSper channels (Figure 3a). Figure 3b illustrates the opening of CatSper by progesterone: the current amplitudes are considerably larger in the presence of progesterone. We performed this experiment also with the UV blocker 4-MBC (Figure 3b, bottom): 4-MBC potentiates the CatSper currents, demonstrating that EDCs imitate the progesterone action on CatSper. Next, we investigated whether EDCs stimulated behavioral responses similar to progesterone. To this end, we analyzed flagellar beat under the microscope. The flagellar beat is very regular and symmetric (Figure 4a). However, addition of 4-MBC decreases the beat frequency and the beating pattern becomes asymmetric (Figure 4b) – a characteristic feature of hyperactive swimming. Moreover, we were able to show that EDCs also trigger the acrosome reaction. At first glance, the EDC action on sperm would not appear to represent a threat – after all, CatSper activation, hyperactivation, and the acrosome reaction are all needed anyway for fertilization.

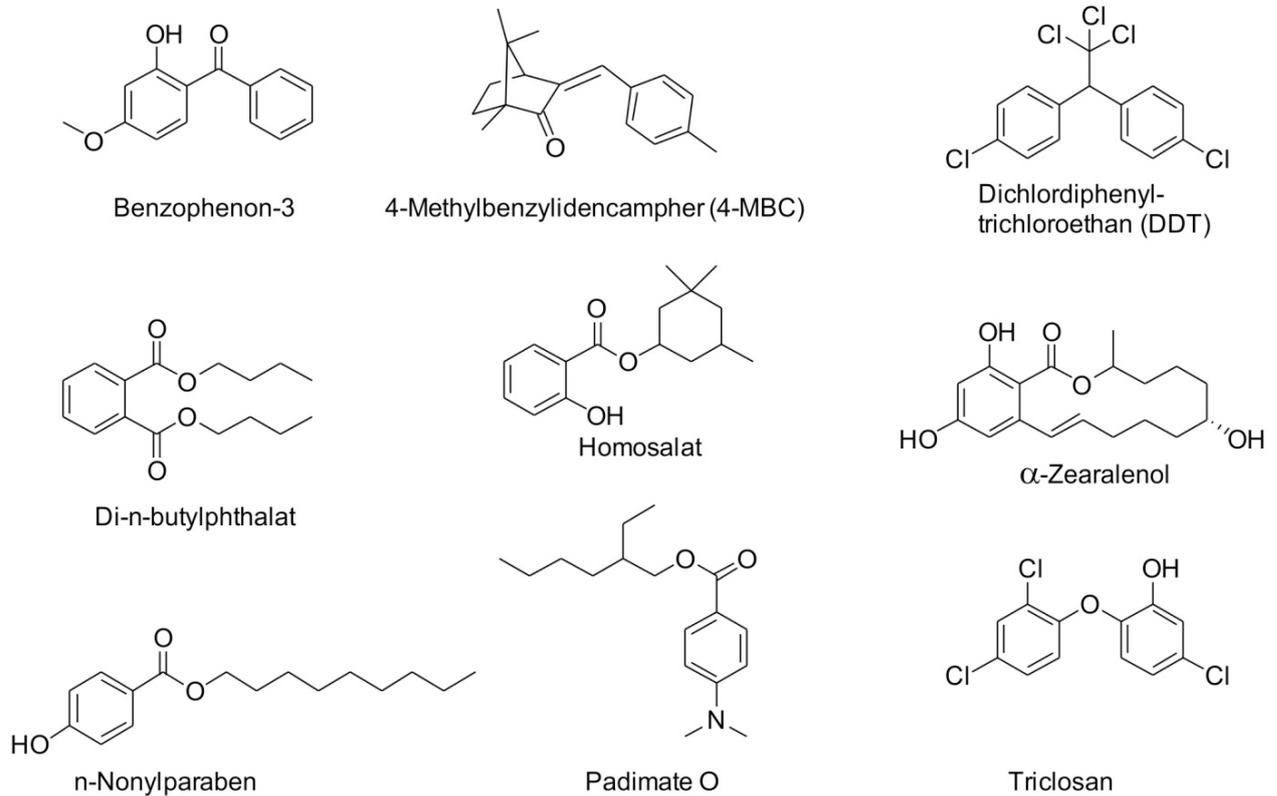


Abbildung 2: Chemische Strukturen von EDCs, die Kalzium-Antworten in menschlichen Spermien auslösen.

Wir haben zunächst untersucht, ob EDCs – ebenso wie Progesteron – die CatSper-Kanäle öffnen und so einen Kalzium-Einstrom auslösen. Dazu haben wir die winzigen Ionenströme durch den CatSper-Kanal mit der Patch-Clamp-Technik gemessen. Dies gelingt über eine mikroskopisch dünne Glaselektrode, die man auf die Spermienmembran aufsetzt. So lässt sich – wie mit einem Stethoskop in der Medizin – das Öffnen und Schließen der CatSper-Kanäle verfolgen (Abbildung 3a). Abbildung 3b zeigt, wie Progesteron die CatSper-Kanäle aktiviert: Die Stromamplituden sind in Anwesenheit von Progesteron deutlich größer. Wir haben dieses Experiment auch für den UV-Blocker 4-MBC durchgeführt (Abbildung 3b, unten): 4-MBC potenziert die Ströme durch den CatSper-Kanal. Das zeigt, dass EDCs die Progesteronwirkung auf die CatSper-Kanäle imitieren. Wir haben nun untersucht, ob EDCs ähnliche Verhaltensantworten wie Progesteron in Spermien auslösen. Dazu haben wir das Schlagmuster des Spermienflagellums unter dem Mikroskop beobachtet. Der Flagellenschlag ist sehr regelmäßig und symmetrisch

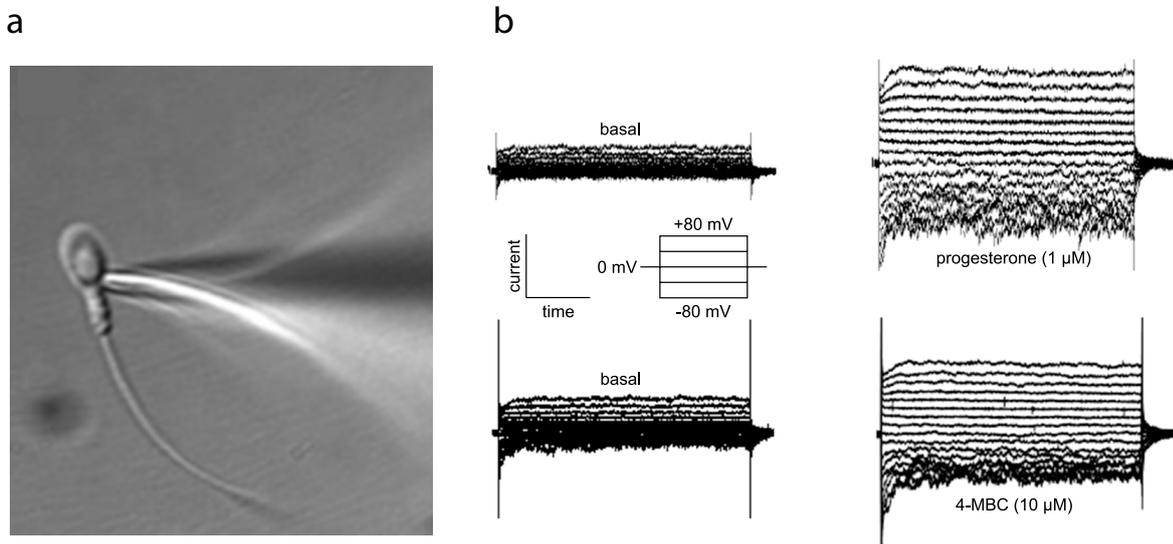


Figure 3: EDC-induced CatSper currents, recorded with the patch-clamp technique. a. A glass electrode is placed carefully on the “neck” of the sperm. The membrane patch below the electrode opening is then disrupted with a short pulse of negative pressure to gain electric access to the sperm’s interior. This technique can be used to measure minute currents of a few hundred picoamperes, flowing through the ion channels in the sperm membrane. b. CatSper currents in human sperm in the absence (left; basal) and presence of progesterone and 4-MBC. The CatSper currents were recorded at membrane potentials of -80 mV to +80 mV (Figure 3a from [2]).

In contrast to progesterone, however, EDCs are not present exclusively in the vicinity of the egg, but rather throughout the female reproductive tract. If EDCs already trigger hyperactivation at the entrance of the oviduct, hyperactivated sperm may get left behind and fail to reach the egg.

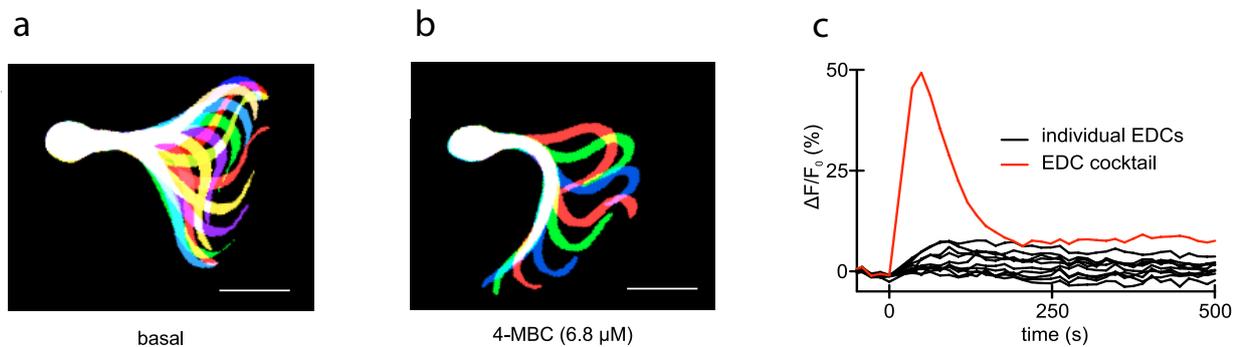


Figure 4: EDCs change sperm motility and cooperate to trigger calcium responses. Flagellar beating pattern of sperm before (a) and after (b) stimulation with 4-MBC (6.8 μM). Superimposed single images taken during the beat cycle. Scale bar = 15 μm. c. Calcium responses of sperm, evoked by individual EDCs at very low concentrations (black) and by a cocktail of EDCs at the same individual concentrations (red).

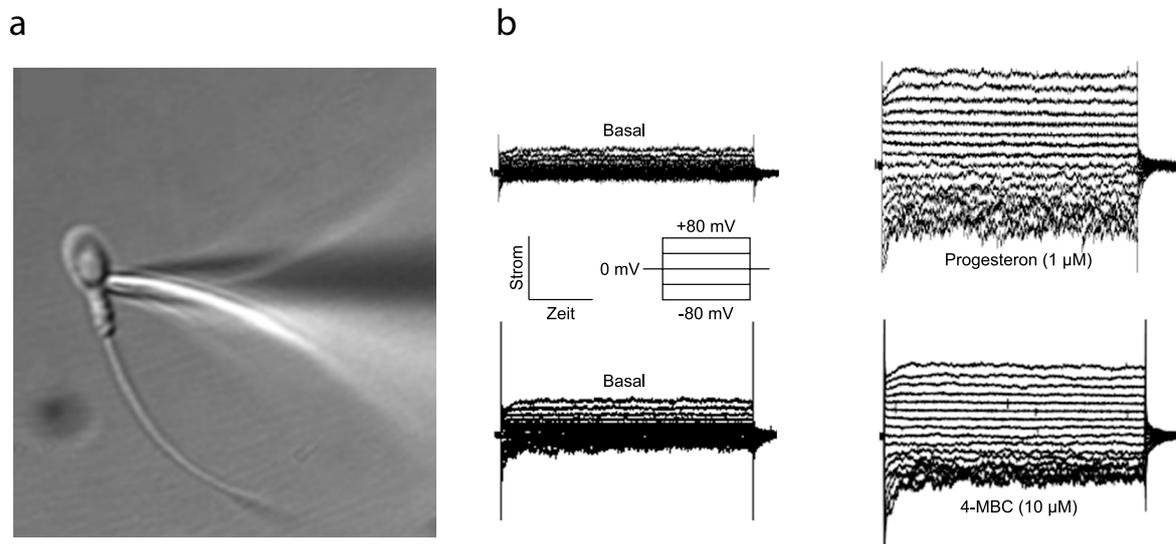


Abbildung 3: EDC-induzierte CatSper-Ströme, gemessen mit der Patch-Clamp-Technik. **a.** Eine Glaselektrode wird vorsichtig im Bereich des „Nackens“ auf das Spermium aufgesetzt. Anschließend wird die Membran unter der Elektrodenöffnung durch einen kurzen Unterdruck zerstört; so erhält man einen elektrischen Zugang zum Inneren des Spermiums. Mit dieser Technik können winzige Ströme im Bereich von wenigen hundert Picoampere durch Ionenkanäle in der Spermienmembran gemessen werden. **b.** CatSper-Ströme in menschlichen Spermien in Abwesenheit (links; basal) und Anwesenheit von Progesteron bzw. 4-MBC. Die CatSper-Ströme wurden bei Membranspannungen von -80 mV bis +80 mV aufgenommen (Abbildung 3a aus [2]).

(Abbildung 4a). Gibt man jedoch zur Badlösung 4-MBC, so wird die Schlagfrequenz geringer und das Schlagmuster asymmetrisch (Abbildung 4b) – charakteristisch für hyperaktives Schwimmen. Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass EDCs auch die Akrosomreaktion auslösen. Auf den ersten Blick erscheint die EDC-Wirkung auf Spermien nicht bedrohlich zu sein – CatSper-Aktivierung, Hyperaktivierung und Akrosomreaktion sind schließlich notwendig, um die Eizelle zu befruchten!

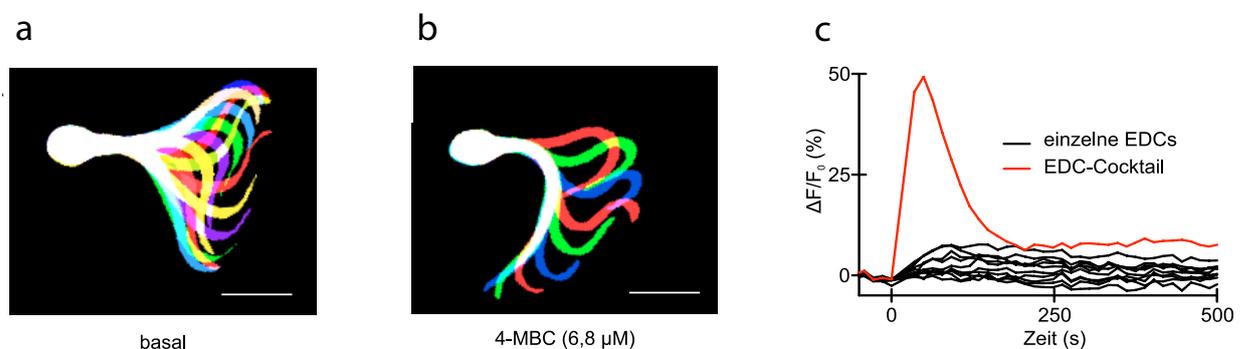


Abbildung 4: EDCs ändern die Spermienmotilität und kooperieren bei der Auslösung von Kalzium-Antworten. Spermien-Flagellenschlagmuster vor (a) und nach (b) Stimulation mit 4-MBC (6,8 µM). Schrittweise aufgenommene, übereinander gelegte Aufnahmen des Schlagzyklus eines Spermiums. Balken = 15 µm. c. Kalzium-Antworten von Spermien, ausgelöst durch einzelne EDCs in sehr geringen Konzentrationen (schwarz) und durch ein EDC-Cocktails bei denselben Einzelkonzentrationen (rot).

Once it reaches the egg, each sperm has only one shot at penetrating the egg's protective vestments. If the enzyme cocktail is not released at the right place and time, it fizzles out ineffectively and the sperm is no longer capable of fertilization. EDCs can "cheat" the sperm into "thinking" that they have reached the egg, thus, triggering the acrosome reaction far too soon. In other words: an EDC-induced hyperactivation and acrosome reaction could interfere considerably with the complex steps of fertilization. It gets even worse: in the presence of EDCs, sperm become "blind" to progesterone. If sperm are bathed in 4-MBC, their sensitivity to progesterone is reduced by 50%.

How far can our research results in the laboratory be applied to "everyday life"? The concentration dependence of the EDC effects on sperm is the key factor in this respect: in many cases, the EDCs are effective at concentrations that are also detectable in the body in real life. For example, when certain sunscreens are applied, the concentration of UV blockers in the blood rises to values which evoke calcium responses in sperm in the laboratory.

In our daily life, however, we are exposed to a variety of EDCs simultaneously. How did we account for this circumstance in our study? We added a number of EDCs to sperm in two separate experimental set-ups, and measured the resultant calcium responses: in one, each individual EDC was added at its threshold concentrations to evoke a calcium response, while in the other, the EDCs were added together at the same concentrations, as an "EDC cocktail" (Figure 4c). As expected, when added alone, the individual EDCs evoked miniscule calcium responses. In the cocktail, however, the miniscule effects of the individual EDCs added up to one considerable calcium signal. Thus, EDCs cooperate to a certain extent, at least when it comes to interfering with sperm function.

In summary, it may be said that EDCs can impair fertilization in a number of ways: calcium responses control key sperm functions, such as navigation in the female reproductive tract, hyperactivation and the acrosome reaction. Progesterone, which is released by cells surrounding the egg, synchronizes these sperm functions in a precisely coordinated temporal and spatial rhythm. EDCs can lead the sperm astray, and can trigger both hyperactivation and the acrosome reaction at the wrong time and in the wrong place.

Our study, however, could not deliver the final proof that EDCs contribute to the increase in fertility disorders in the West. German law, namely, prohibits studies to determine whether the fertilization of human egg is truly less effective in the presence of EDCs. Since rodents possess different sperm-attractant systems, these experimental animals are not a suitable model for the situation in humans.

Im Gegensatz zu Progesteron sind die EDCs jedoch nicht ausschließlich in der Nähe der Eizelle zu finden, sondern über den gesamten weiblichen Genitaltrakt verteilt. Wird die Hyperaktivierung durch EDCs bereits am Eingang zum Eileiter ausgelöst, bleiben die hyperaktiven Spermien womöglich auf der Strecke und gelangen nicht zum Ei.

An der Eizelle angekommen, hat jedes Spermium nur einen einzigen Schuss, um die Eihülle zu durchdringen. Wenn der Enzymcocktail nicht an der richtigen Stelle und zur richtigen Zeit freigesetzt wird, verpufft er wirkungslos und das Spermium ist nicht mehr befruchtungsfähig. EDCs können den Spermien vorgaukeln, sie wären an der Eizelle angelangt und die Akrosomreaktion viel zu früh auslösen. Kurz gesagt: eine EDC-induzierte Hyperaktivierung und Akrosomreaktion könnte den komplizierten Befruchtungsvorgang erheblich stören. Und es kommt noch schlimmer: In Anwesenheit von EDCs werden Spermien „blind“ für Progesteron: Badet man Spermien in 4-MBC, ist deren Empfindlichkeit für Progesteron um 50% reduziert.

Wie weit lassen sich unsere Forschungsergebnisse aus dem Labor auf den „Alltag“ übertragen? Hier ist die Konzentrationsabhängigkeit der EDC-Effekte auf die Spermien entscheidend: In vielen Fällen sind die EDCs in Konzentrationen wirksam, die man tatsächlich auch im Körper nachweisen kann. Ein Beispiel: Nach dem Auftragen bestimmter Sonnenschutzprodukte steigt die Konzentration von UV-Blockern im Blut auf Werte an, die im Labor bereits deutliche Kalzium-Antworten in Spermien auslösen.

In unserem Alltag sind wir allerdings einer Vielzahl verschiedener EDCs gleichzeitig ausgesetzt. Wie konnten wir diesen Umstand in unserer Studie abbilden? Wir haben mehrere EDCs gleich zweimal zu Spermien gegeben und deren Kalzium-Antworten gemessen: Einmal alleine, in Konzentrationen, die am Schwellenwert für die Auslösung von Kalzium-Antworten liegen, und einmal zusammen in denselben Konzentrationen als „EDC-Cocktail“ (Abbildung 4c). Einzelne lösen die EDCs erwartungsgemäß sehr kleine, kaum messbare Kalzium-Antworten aus. In dem Cocktail addieren sich die winzigen Einzelwirkungen der EDCs jedoch zu einem großen Kalzium-Signal. EDCs arbeiten also gewissermaßen zusammen, wenn es um die Störung der Spermienfunktion geht.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die EDCs die Befruchtung in mehrerlei Hinsicht beeinträchtigen könnten: Kalzium-Antworten kontrollieren wichtige Spermienfunktionen wie die Navigation im weiblichen Genitaltrakt, die Hyperaktivierung und die Akrosomreaktion. Progesteron, das von der Eizelle abgegeben wird, synchronisiert diese Spermienfunktionen in einem zeitlich und räumlich präzise abgestimmten Takt. EDCs könnten die Spermien fehlleiten und

On the other hand, our study does show that human sperm are suitable as a test system for the investigation and risk assessment of EDCs. The EU Commission is currently reviewing guidelines for EDC limit values. However, our cocktail experiment shows that limit values for individual EDCs do not offer sufficient protection, since the effects of EDCs can be additive. Thus, our work has provided scientific evidence that could help to establish new guidelines.

References

- [1] Schiffer, C., Müller, A., Egeberg, D.L., Alvarez, L., Brenker, C., Rehfeld, A., Frederiksen, H., Wäschle, B., Kaupp, U.B., Balbach, M., Wachten, D., Skakkebaek, N.E., Almstrup, K. & Strünker, T. (2014) "Direct action of endocrine disrupting chemicals on human sperm" *EMBO Rep.*, DOI:10.15252/embr.201438869
- [2] Lishko, P.V., Botchkina, I.L., Fedorenko, A., Kirichok, Y. (2010) "Acid extrusion from human spermatozoa is mediated by flagellar voltage-gated proton channel" *Cell* 140, 327-337



die Hyperaktivierung sowie die Akrosomreaktion zur falschen Zeit und am falschen Ort auslösen.

Den endgültigen Beweis, dass EDCs mitverantwortlich sind für die Zunahme von Fruchtbarkeitsstörungen in der westlichen Welt, können wir jedoch mit unserer Studie nicht liefern. In Deutschland ist es nämlich verboten zu untersuchen, ob menschliche Eizellen tatsächlich in Anwesenheit von EDCs weniger effizient befruchtet werden. Da in Nagetieren andere Lockstoffsysteme den Spermien ihren Weg weisen, sind diese als Modellorganismen ungeeignet.

Unsere Studie zeigt jedoch, dass sich menschliche Spermien als Testsystem für die Untersuchung und Risikoabschätzung von EDCs eignen. Die EU-Kommission überprüft derzeit Richtlinien über Grenzwerte für EDCs. Unser Cocktail-Experiment zeigt jedoch, dass Grenzwerte für einzelne EDCs keinen ausreichenden Schutz bieten, da sich die Wirkungen von EDCs addieren können. Damit liefert unsere Arbeit wissenschaftliche Belege, die helfen können, neue Richtlinien zu erarbeiten.

Literatur

[1] Schiffer, C., Müller, A., Egeberg, D.L., Alvarez, L., Brenker, C., Rehfeld, A., Frederiksen, H., Wäsche, B., Kaupp, U.B., Balbach, M., Wachten, D., Skakkebaek, N.E., Almstrup, K. & Strünker, T. (2014) "Direct action of endocrine disrupting chemicals on human sperm" *EMBO Rep.*, DOI:10.15252/embr.201438869

[2] Lishko, P.V., Botchkina, I.L., Fedorenko, A., Kirichok, Y. (2010) "Acid extrusion from human spermatozoa is mediated by flagellar voltage-gated proton channel" *Cell* 140, 327-337

Cred1 – The key to the heart

Dagmar Wachten

Heart valve defects are a common cause of death in newborns. In collaboration with scientists at the University of Bonn, we discovered the “*Cred1* gene” in mice as a key regulator for the generation of heart valves. The *Cred1* gene in mice and humans is very similar. We were able to show that *Cred1* controls the same signaling pathway in the hearts of both mice and humans and how defects in *Cred1* signaling pathway affect cardiac development. This discovery is important for the molecular understanding of congenital heart valve defects.

Contact

Dagmar Wachten
 Research Center caesar
 Max Planck Research Group
 Molecular Physiology
 Phone: +49 (0)228 9656-311
dagmar.wachten@caesar.de

Malformations of the heart are among the most common disorders of newborns and represent the number one cause of death during the first year of life. Defects of

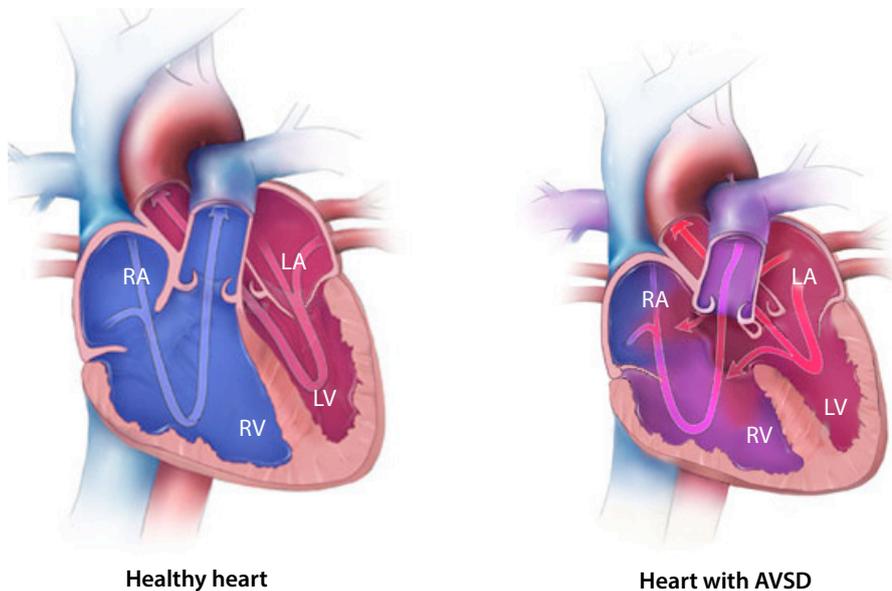


Figure 1: AVSD – a congenital heart defect. The heart is divided into four chambers – the left and right atrium (RA, LA), and the right and left ventricle (RV, LV). Oxygen-poor blood (blue) from the body’s bloodstream reaches the heart via the right atrium, while the right ventricle pumps it towards the lungs, allowing it to enter the pulmonary circulation. Once there, the blood is enriched with oxygen (red) and returns to the heart into the left atrium and then the left ventricle, which pumps it back into the body. The separation of the right and left sides by a wall called the cardiac septum ensures that oxygen-poor and oxygen-rich blood do not mix. In patients with AVSD (atrioventricular septal defect), this septum is not fully formed. In most of these cases, the heart valves, which direct the flow of the blood from the atria into the ventricles, are also defective. The result is that oxygen-poor and oxygen-rich blood mix, so that less oxygen reaches the body. This means that the body becomes deficient in oxygen, impairing physical performance.

Der Schlüssel zum Herzen – Creld1

Dagmar Wachten

Kontakt

Dagmar Wachten
 Forschungszentrum caesar
 Max-Planck-Forschungsgruppe
 Molekulare Physiologie
 Telefon: +49 (0)228 9656-311
 dagmar.wachten@caesar.de

Herzklappenfehler sind eine häufige Todesursache bei Neugeborenen. Zusammen mit Wissenschaftlern der Universität Bonn haben wir in der Maus das „*Creld1*-Gen“ als Schlüssel für die Heranreifung der Herzklappen entdeckt. Das *Creld1*-Gen ist bei Maus und Mensch sehr ähnlich. Wir konnten zeigen, dass *Creld1* im Herzen der Maus und des Menschen den gleichen Signalweg kontrolliert und welche Auswirkungen Defekte in diesem Signalweg auf die Herzentwicklung haben. Diese Entdeckung ist wichtig für das molekulare Verständnis der Entstehung von angeborenen Herzklappendefekten.

Fehlbildungen des Herzens gehören zu den häufigsten Erkrankungen bei Neugeborenen und sind die Todesursache Nummer eins im ersten Lebensjahr.

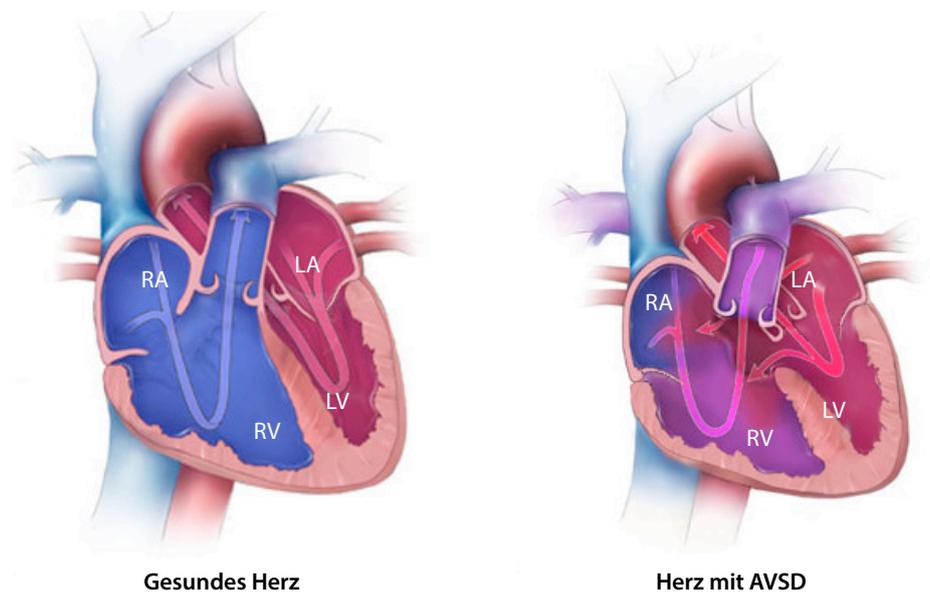


Abbildung 1: AVSD – ein angeborener Herzdefekt. Das Herz ist in vier Abschnitte – linkes und rechtes Atrium (RA, LA) sowie rechter und linker Ventrikel (RV, LV) – unterteilt. Sauerstoffarmes Blut (blau) erreicht das Herz aus dem Körperkreislauf über das rechte Atrium und wird über den rechten Ventrikel in den Lungenkreislauf gepumpt. Dort wird das Blut mit Sauerstoff angereichert (rot) und gelangt dann über das linke Atrium in den linken Ventrikel, von wo es in den Körper gepumpt wird. Die Trennung der rechten und linken Seite durch die Herzscheidewand (Septum) stellt sicher, dass sich sauerstoffarmes und sauerstoffreiches Blut nicht mischen. Bei Patienten mit AVSD (*atrioventricular septal defect*) ist das Septum nur unvollständig ausgebildet. Ebenso sind meist die Herzklappen, die einen gerichteten Blutfluss von den Atria in die Ventrikel ermöglichen, defekt. Daraus resultiert, dass sich sauerstoffarmes und sauerstoffreiches Blut mischt, wodurch insgesamt weniger Sauerstoff in den Körper gelangt. Dadurch liegt eine Unterversorgung des Körpers mit Sauerstoff vor, wodurch die Leistung beeinträchtigt wird.

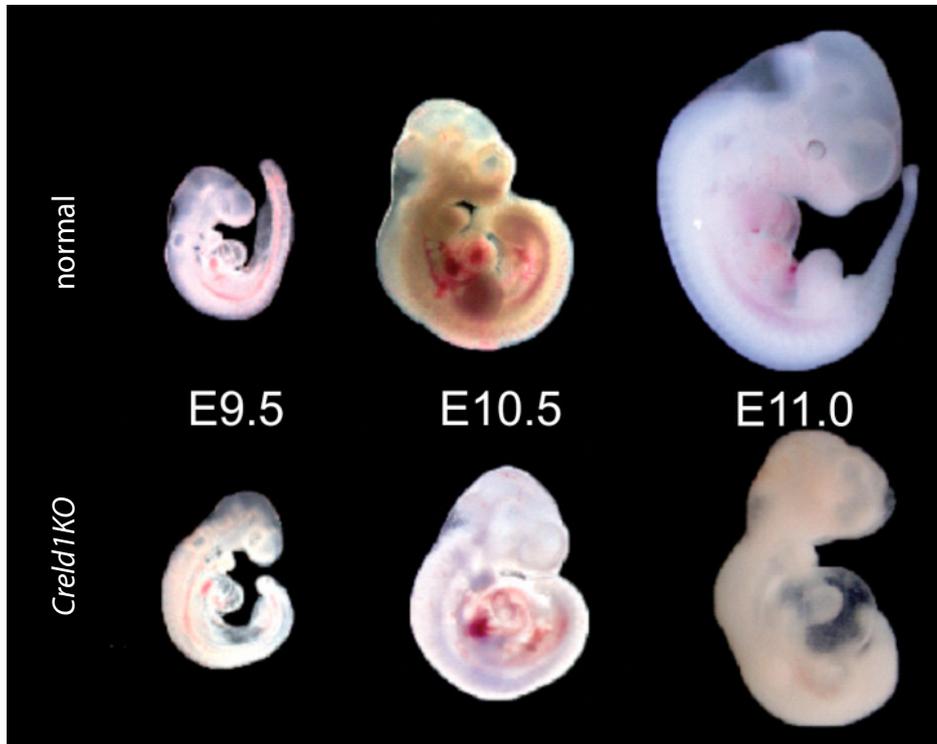


Figure 2: *Creld1* knock-out embryos (*Creld1KO*) die on day E11 of their development. Normal and *Creld1KO* embryos were isolated on different days of embryonic development (E9.5, E10.5, E11.0). Up to day E10.5, the two embryos are indistinguishable; on day E11.0, however, the *Creld1KO* embryos are already dead.

the heart valves and cardiac septa are particularly common. One of these malformations is referred to as AVSD (atrioventricular septal defect). The heart valves and septa divide the human heart into four chambers – the two atria and the two ventricles. Patients with AVSD show incomplete separation between the atria and ventricles. This causes the oxygen-rich blood from the pulmonary (lung) circulation to mix with the oxygen-poor blood from the main bloodstream. As a result, the body cannot be adequately supplied with oxygen (Figure 1).

In a cooperative effort within the ImmunoSensation Cluster of Excellence, working together with researchers from the LIMES Institute in Bonn, we were able to identify *Creld1* (cysteine-rich with EGF-like domains 1) as a new key protein in the development of the heart. In order to analyze the function of *Creld1* *in vivo*, we produced a knock-out mouse for *Creld1* (*Creld1KO*). This mouse lacks the *Creld1* gene, so that it does not synthesize the *Creld1* protein. *Creld1KO* mice die of a heart defect on the eleventh day (E11) of embryonic development (Figure 2).

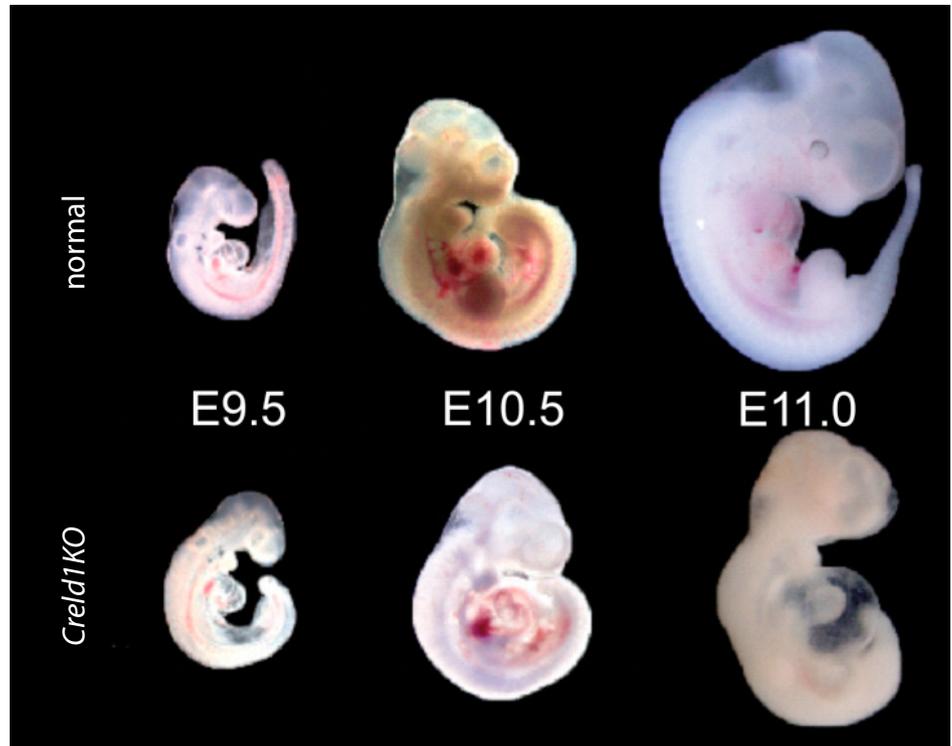


Abbildung 2: *Creld1* Knockout-Embryonen (*Creld1KO*) sterben an Tag 11 der Embryonalentwicklung. Normale und *Creld1KO*-Embryonen wurden an verschiedenen Tagen der Embryonalentwicklung (E9.5, E10.5, E11.0) isoliert. Bis zu Tag E10.5 sind die beiden Embryonen nicht voneinander zu unterscheiden, an Tag E11.0 sind die *Creld1KO*-Embryonen jedoch bereits tot.

Besonders häufig treten Defekte in den Herzklappen und den Herzscheidewänden auf. Eine solche Fehlbildung bezeichnet man als AVSD (*atrioventricular septal defect*). Durch die Herzklappen und Herzscheidewände wird das Herz des Menschen in vier Abschnitte geteilt – die beiden Vorhöfe (Atria) und die beiden Kammern (Ventrikel). Patienten mit AVSD weisen eine unvollständige Trennung der Atria und Ventrikel auf. Dadurch mischt sich das sauerstoffreiche Blut des Lungenkreislaufs mit dem sauerstoffarmen Blut des Körperkreislaufs. Eine ausreichende Versorgung des Körpers kann so nicht gewährleistet werden (Abbildung 1).

Durch eine Kooperation im Rahmen des Exzellenzclusters *ImmunoSensation* ist es uns zusammen mit Forschern des Bonner LIMES-Instituts gelungen, *Creld1* (*Cysteine-rich with EGF-like domains 1*) als ein neues Schlüsselprotein in der Herzentwicklung zu identifizieren. Um die Funktion von *Creld1* *in vivo* zu analysieren, stellten wir eine *Knock-out*-Maus für *Creld1* (*Creld1KO*) her. Dieser Maus fehlt das *Creld1*-Gen, wodurch das *Creld1*-Protein nicht mehr gebildet wird. *Creld1KO*-Mäuse sterben am elften Tag der Embryonalentwicklung an einem Herzdefekt (Abbildung 2).

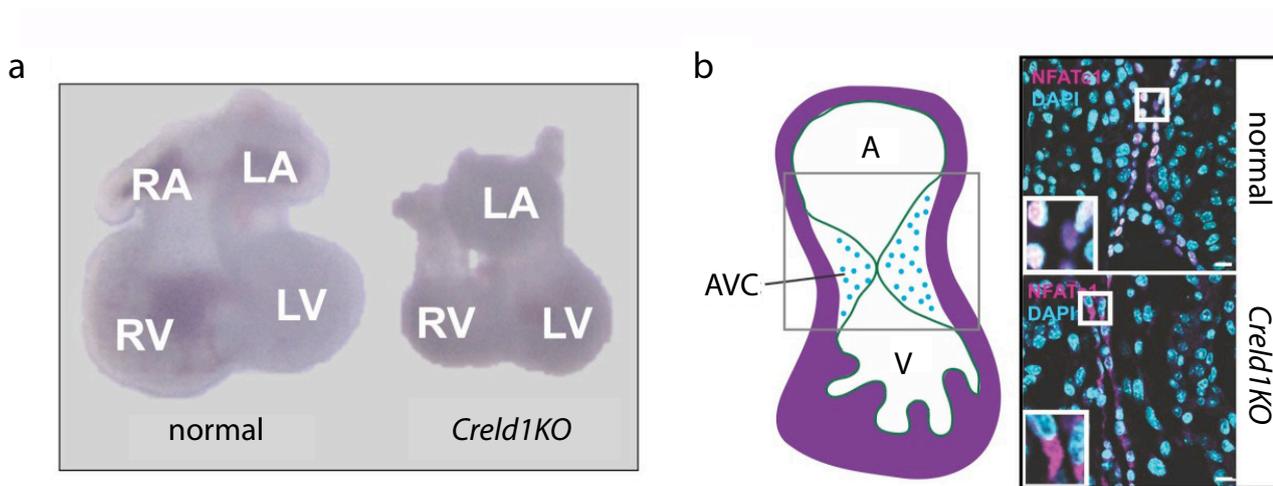


Figure 3: *Creld1* controls the development of the heart. **a.** Hearts from mouse embryos, isolated on day E10.5 of embryonic development. At this point, the normal heart is already divided into two atria and two ventricles. In contrast, the heart from a *Creld1KO* embryo is at an immature stage, in which the two ventricles are only partly separated. RA, LA: right and left atrium; RV, LV: right and left ventricle. **b.** Location of NFATc1 in the atrioventricular cushion (AVC). Left: schematic diagram of a mouse embryonic heart. The region from which the heart valves subsequently develops (the AVC) is highlighted. A: future atria, V: future ventricles. Right: sections through an embryo heart on day E10 of embryonic development. The AVC region is shown. NFATc1 was labeled with an antibody (violet). The DNA in the cell nuclei was stained with DAPI (blue). As can be seen in the magnification, *Creld1KO* embryos show impaired NFATc1 translocation (migration into the cell nucleus). Scale bar: 20 µm.

The heart valve precursors, the so called atrioventricular cushion (AVC) do not develop in *Creld1KO* mice; the separation into atria and ventricles remains incomplete (Figure 3a). We were able to show that *Creld1* controls the calcineurin/NFAT signaling pathway. This signaling pathway is decisive for the separation of the atria and ventricles and controls cell growth in the AVC. Calcineurin is an enzyme, a phosphatase, which controls the activity of NFATc1 – a transcription factor. Transcription factors migrate into the cell nucleus, bind to DNA, and regulate gene expression. *Creld1KO* mice show marked impairment of this signaling pathway: their calcineurin activity is reduced, preventing the migration of NFATc1 into the cell nucleus (Figure 3b). The translocation of NFATc1 to the nucleus is particularly important in the AVC. In *Creld1KO* embryos, the cells in the AVC no longer divide and the heart valves are not formed.

Mutations in the human *CRELD1* gene have been associated with the onset of AVSD. To date, however, it has not been clear whether AVSD is actually caused by these mutations. The underlying molecular mechanism also remains unknown. Therefore, we introduced *CRELD1* gene mutations found in patients with AVSD into the *Creld1* gene of the mouse, and used cell culture methods to investigate, whether this impairs the function of the calcineurin/NFAT signaling pathway. Two of the most common mutations reduced the *Creld1*-dependent migration of NFATc1 into the cell nucleus and, thereby, NFATc1-dependent gene expression. These results suggest that

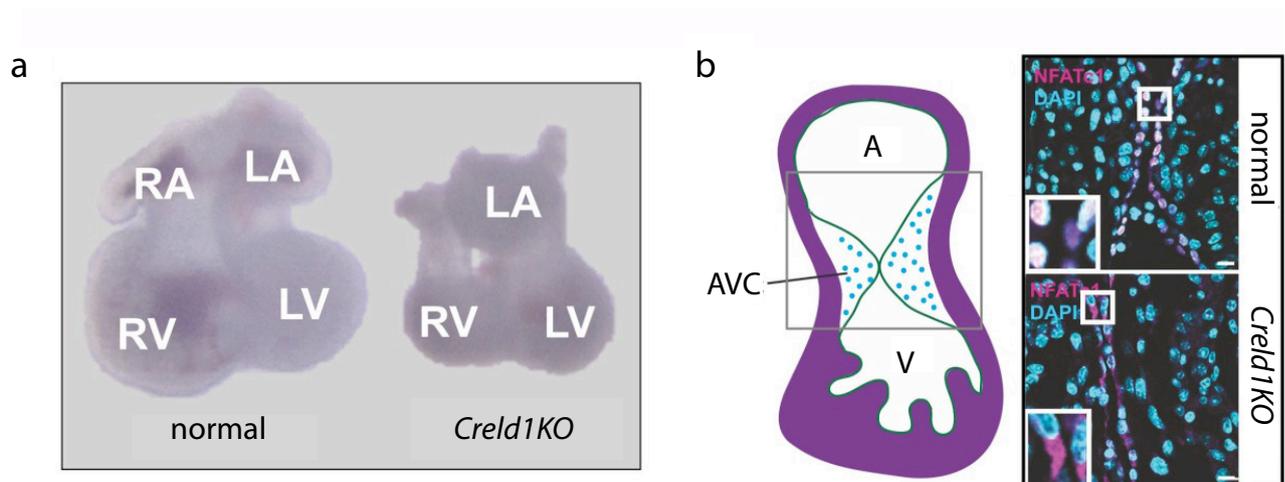


Abbildung 3: Creld1 kontrolliert die Herzentwicklung. a. Herzen aus Mausembryonen, isoliert am elften Tag der Embryonalentwicklung. Das normale Herz ist zu diesem Zeitpunkt bereits in zwei Atria und zwei Ventrikel unterteilt. Das Herz aus einem *Creld1KO*-Embryo dagegen befindet sich in einem unreifen Stadium, in dem nur die beiden Ventrikel ansatzweise getrennt sind. RA, LA: rechtes und linkes Atrium; RV, LV: rechter und linker Ventrikel. b. Lokalisation von NFATc1 im atrioventrikulären Kanal (atrioventricular cushion, AVC). Links: Schemazeichnung eines embryonalen Mauserzens. Die Region, aus der sich später die Herzklappen entwickeln (AVC), ist eingezeichnet. A: zukünftige Atria, V: zukünftige Ventrikel. Rechts: Schnitte eines embryonalen Herzens am zehnten Tag der Embryonalentwicklung. Gezeigt ist der Bereich des AVC. NFATc1 wurde mit einem Antikörper markiert (lila). Die DNA im Zellkern wurde mit DAPI (blau) gefärbt. Wie in der Vergrößerung zu sehen, ist die Translokation (Wanderung in den Zellkern) von NFATc1 bei *Creld1KO*-Embryonen gestört. Größenstandard: 20 μm .

Bei *Creld1KO*-Mäusen bilden sich die Vorläufer der Herzklappen nicht aus; die Trennung in Atria und Ventrikel bleibt unvollständig (Abbildung 3a). Wir konnten zeigen, dass *Creld1* den Calcineurin/NFAT-Signalweg kontrolliert. Dieser Signalweg ist entscheidend für die Trennung der Atria und Ventrikel. Calcineurin ist ein Enzym, eine Phosphatase, die die Aktivität von NFATc1 – einem Transkriptionsfaktor – kontrolliert. Transkriptionsfaktoren wandern in den Zellkern, binden an DNA und steuern die Genexpression. *Creld1KO*-Mäuse zeigen eine deutliche Beeinträchtigung dieses Signalwegs; die Aktivität von Calcineurin ist reduziert. Auf diese Weise wird die Wanderung von NFATc1 in den Zellkern verhindert (Abbildung 3b). Dies passiert genau dort, wo sich die Vorläufer der Herzklappen bilden sollen – im sogenannten atrioventrikulären Kanal (atrioventricular cushion, AVC). Dadurch teilen sich die Zellen im AVC nicht mehr und die Herzklappen werden nicht ausgebildet.

Mutationen im humanen *CRELD1*-Gen werden mit dem Auftreten von AVSD in Verbindung gebracht. Jedoch war bislang unklar, ob diese Mutationen tatsächlich die Ursache für die Entstehung von AVSD sind. Auch der zugrundeliegende molekulare Mechanismus ist nicht bekannt. Daher brachten wir die Mutationen im *CRELD1*-Gen, die man bei Patienten mit AVSD findet, in das *Creld1*-Gen der Maus ein und untersuchten in Zellkultur, ob dadurch die Funktion des Calcineurin/NFAT-Signalwegs beeinträchtigt ist. Zwei der am häufigsten Mutationen reduzierten die



mutations in the *CRELD1* gene influence the activity of the calcineurin/NFAT signaling pathway also in humans, and could therefore be involved in the generation of AVSD. In the future, we will gain an even better understanding of the function of *Crel1*, in order to develop potential treatment approaches for AVSD.

Reference

Mass, E., Wachten, D., Aschenbrenner, A.C., Voelzmann, A. & Hoch, M. (2014) "Murine *Crel1* Controls Cardiac Development through Activation of Calcineurin/NFATc1 Signaling" *Dev. Cell* 28, 711-726



Creld1-abhängige Wanderung von NFATc1 in den Zellkern und damit die NFATc1-abhängige Genexpression. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Mutationen im *CRELD1*-Gen auch beim Menschen die Aktivität des Calcineurin/NFAT-Signalwegs beeinflussen und so an der Entstehung von AVSD beteiligt sein könnten. In weiterführenden Experimenten werden wir versuchen, die Funktion von Creld1 noch besser zu verstehen, um so mögliche Therapieansätze für AVSD zu entwickeln.

Literatur

Mass, E., Wachten, D., Aschenbrenner, A.C., Voelzmann, A. & Hoch, M. (2014) "Murine Creld1 Controls Cardiac Development through Activation of Calcineurin/NFATc1 Signaling" *Dev. Cell* 28, 711-726

Why do we need to know the structural dynamics of proteins? – On the quest for novel drugs

Elmar Behrmann

Most of our body's proteins are not static but dynamic entities. Their structure is thus subject to constant change. We are developing methods to analyze and visualize these structural dynamics, with the aim of better understanding our proteins. This will improve the rational design of drugs. Our research is supported by the *Freigeist*-program of the *VolkswagenStiftung*.

The coming decade will be the decade of personalized medicine. Facilitated increasingly cheaper genetic screens, medical doctors will become able to select exactly that drug, which has shown highest efficacy and least side effects with patients of a similar genetic profile. However, in order to be actually able to select the optimal drug for each patient, we will need a broad selection of distinct therapeutic compounds. These are however still lacking for most diseases. The reason for this? Most therapeutic compounds were not rationally designed, but rather found during large-scale screens.

In order to actually custom-design therapeutic compounds one needs to know which proteins are involved in the disease and understand their function with molecular detail. Similar to an engineer striving to build better machines, we need to understand the structural details of our proteins in order to be able to modify their function, and correct disease-causing errors. However, while a good loupe is in most cases sufficient to analyze the individual parts of a machine, e.g. an intricate clockwork, proteins are too small to be visualized even by our best light microscopes. This is not due to a fault in these microscopes, but due to a physical limitation: the wavelength of visible light is simply too long ("Abbe diffraction limit").

To visualize and analyze proteins we therefore require "light" of a different, shorter wavelength. X-rays, with a wavelength thousand times shorter than that of visible light, can be used to study the diffraction patterns of protein crystals, and thus elucidate their structure. Unfortunately, these protein crystals are not easy to obtain and their formation is often a limiting factor in structural studies. Using a different technique, namely electron microscopy – developed in 1931 by Ernst Ruska –, can circumvent this obstacle. Electron microscopes are very similar to light microscopes. Instead of using visible light these employ magnetic lenses to shape an electron beam, which is transmitted through the sample and then magnified. Since electron beams have a fraction of the wavelength of visible light, they are optimally suited to visualize proteins and their complexes.

Contact

Elmar Behrmann
Research Center caesar
Research Group
Structural Dynamics of Proteins
Phone: +49 (0)228 9656-268
elmar.behrmann@caesar.de

Wozu strukturelle Dynamik von Proteinen? – Auf der Suche nach neuen Medikamenten

Elmar Behrmann

Kontakt

Elmar Behrmann
Forschungszentrum caesar
Forschungsgruppe
Strukturelle Dynamik von Proteinen
Telefon: +49 (0)228 9656-268
elmar.behrmann@caesar.de

Die meisten Proteine unseres Körpers sind ständig in Bewegung. Einzelne Bereiche verschieben sich laufend gegeneinander. Wir entwickeln Methoden, um die strukturelle Dynamik von Proteinen besser zu erfassen und so ihre Funktionsweise genauer zu verstehen. Dies ermöglicht ein gezieltes Design von Medikamenten. Unsere Forschung wird unterstützt durch das Freigeist-Programm der VolkswagenStiftung.

Das kommende Jahrzehnt steht im Zeichen der personalisierten Medizin. Durch immer günstiger werdende genetische Analysen werden Ärzte die Möglichkeit haben, gezielt Wirkstoffe einzusetzen, die zuvor bei Patienten mit einem ähnlichen genetischen Profil erfolgreich waren. Um für jeden Patienten die geeignete Therapie zu finden, benötigen wir jedoch differenziertere Wirkstoffe. Leider gibt es für viele Krankheiten derzeit nur wenige Medikamente, die auf unterschiedlichen Wirkstoffen basieren. Woran liegt das? Medikamente werden meist nicht gezielt entwickelt. Vielmehr wird eine riesige Anzahl von möglichen Wirkstoffen in Studien blind getestet.

Ein gezieltes Design neuer Medikamente erfordert das genaue Wissen darüber, welche Proteine bei der Krankheit beteiligt sind und wie diese funktionieren. Wenn Ingenieure neue Maschinen entwickeln, müssen sie die dahinterliegende Technologie gut verstanden haben. Genauso möchten wir in der Strukturbiologie die Proteine von Grund auf verstehen, um sie gezielt beeinflussen zu können. Um eine Maschine zu untersuchen, kann man sich die einzelnen Bauteile genau ansehen - oft schon mit dem bloßen Auge. Proteine jedoch sind weitaus kleiner als die kleinsten Bauteile einer Maschine. Selbst die besten Lichtmikroskope reichen nicht aus, um die Struktur der Proteine zu erforschen. Dies hat einen physikalischen Grund: Die Wellenlänge von Licht ist zu groß (Stichwort: Abbesche Auflösungsgrenze).

Wir benötigen also „Licht“ mit einer weitaus kleineren Wellenlänge, um Proteine zu beobachten. In der Röntgen-Kristallstrukturanalyse werden zum Beispiel Röntgenstrahlen verwendet. Diese haben nur ein Tausendstel der Wellenlänge von sichtbarem Licht. Wenn man Röntgenstrahlen verwendet, kann man allerdings nur Proteine darstellen, die in einem Kristall angeordnet sind. Diese Kristalle sind schwierig herzustellen und häufig der limitierende Faktor bei Strukturuntersuchungen. Das kann man umgehen: Wir verwenden in unserer Forschungsgruppe eine andere Methode – die 1931 von Ernst Ruska entwickelte

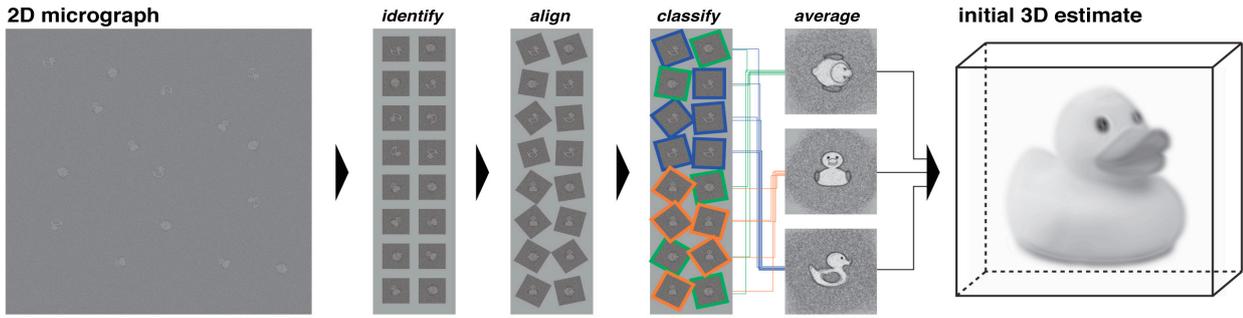


Figure 1: 2D electron microscopic images allow estimating the shape of a 3D object. A sample contains numerous copies of the same object in random orientations. Individual objects are difficult to discern, but can be identified, cut out and aligned. This allows for classification of object images into classes showing the same orientation (green: top view, orange: front view, blue: side view). Summing all object images from each class results in an average image with improved contrast. By relying on class averages showing different views we can calculate the structure of the underlying 3D object – akin to a medical computer tomogram. Due to the limited number of available directions, the resulting 3D structure will almost always be blurred.

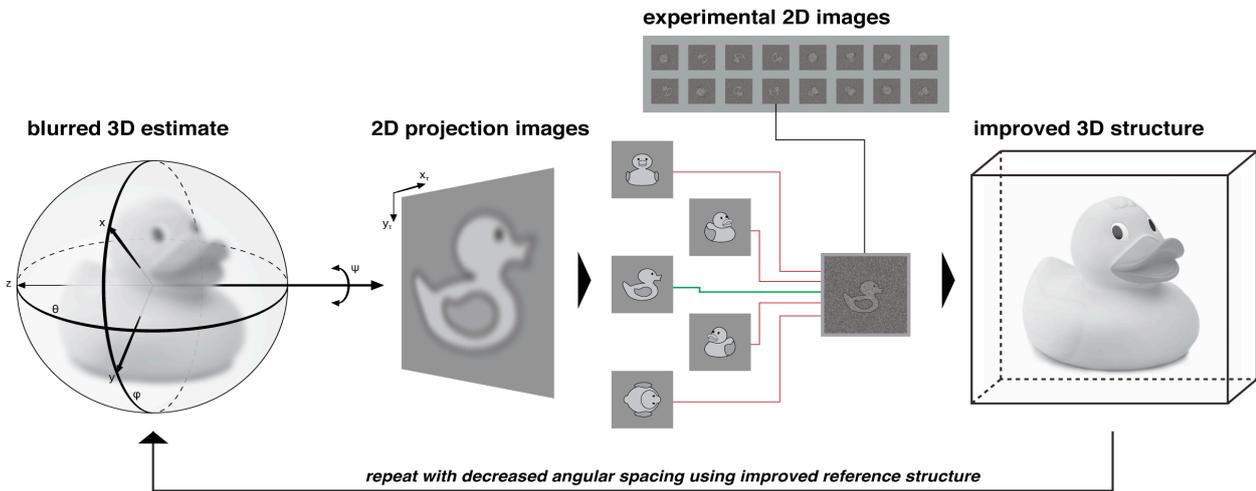


Figure 2: Iterative comparison of experimental data and the resulting 3D model allows improving of the model. Using the initial 3D estimate, one can simulate an unlimited amount of 2D projection images from different directions. By comparing the experimental data to each of the simulated images, one can determine the most likely viewing direction for each of the experimental images. Using these directions, one can then calculate an improved 3D model. By iteratively increasing the number of directions used to simulate projection images, one can calculate increasingly finer and more detailed 3D models.

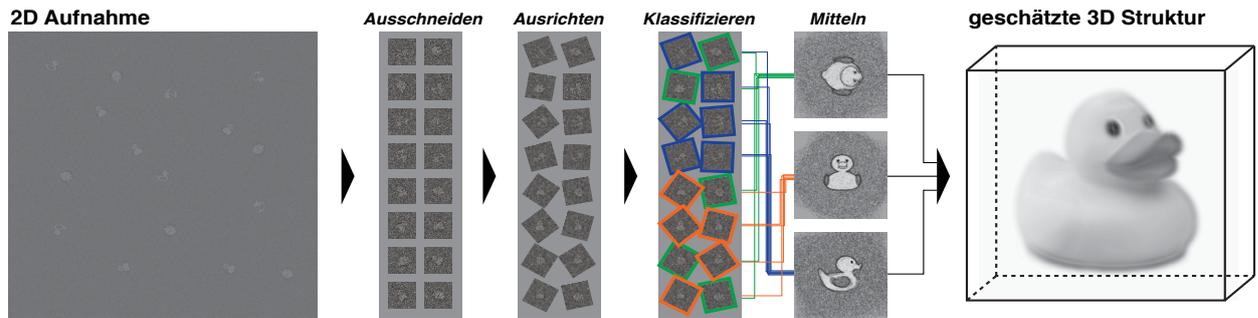


Abbildung 1: Elektronenmikroskopische 2D-Aufnahmen erlauben Rückschlüsse auf die 3D-Form. Eine Probe enthält viele Kopien des gleichen Objektes in zufälligen Orientierungen. Einzelne Objektbilder sind nur schwer zu erkennen. Die Bilder werden identifiziert, ausgeschnitten und neu ausgerichtet. Das ermöglicht uns die Bilder zu klassifizieren – in Gruppen gleicher Ansichten (grün: Draufsicht, orange: Frontansicht, blau: Seitenansicht). Aus der Summe der Einzelbilder einer Klasse erhalten wir ein Bild mit erhöhtem Kontrast. Mithilfe der verschiedenen Ansichten berechnen wir die Form des zugrunde liegenden 3D-Objekts – ähnlich wie bei einem medizinischen Computertomogramm. Da die Anzahl an verschiedenen Raumrichtungen begrenzt ist, wird das 3D-Objekt fast immer verschmiert („unscharf“) sein.

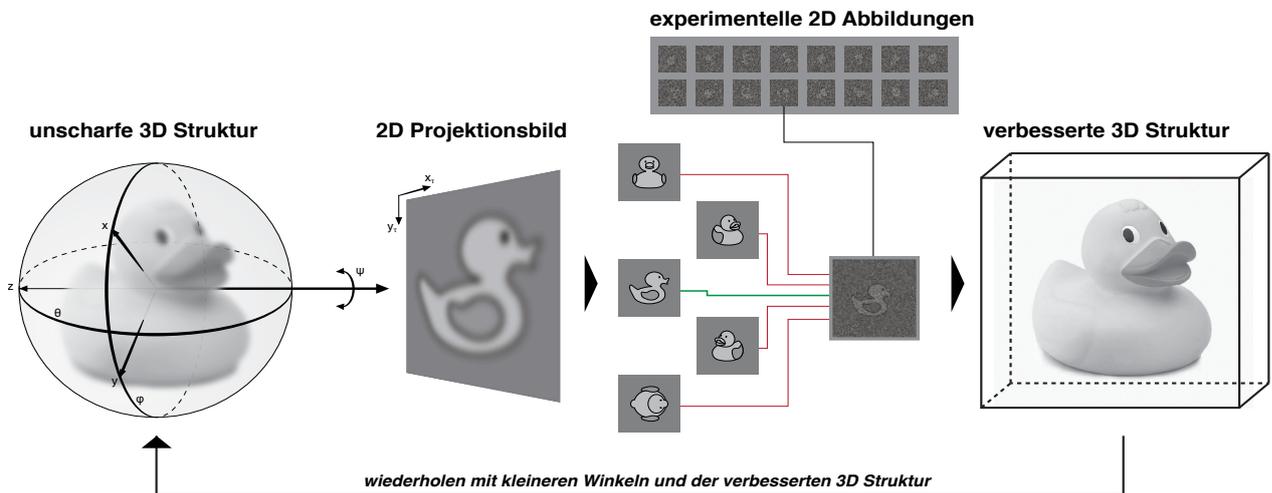


Abbildung 2: Wiederholte Vergleiche mit den experimentellen Daten erlauben eine Verfeinerung des 3D-Modells. Hat man aus den 2D-Aufnahmen ein erstes 3D-Modell erstellt, kann man beliebig viele Projektionsbilder dieses 3D-Modells am Computer erzeugen. Nun vergleichen wir die experimentellen 2D-Objektbilder mit den simulierten Projektionsbildern. Jedem Objektbild wird die Raumrichtung des am besten passenden Projektionsbildes zugeordnet. Aus diesen Ansichten wird wieder ein 3D-Modell berechnet. Da die Anzahl der Ansichten erhöht wurde, hat das neu berechnete 3D-Modell eine feinere räumliche Auflösung als im Schritt zuvor. Auch von diesem neu berechneten 3D-Modell werden wieder Projektionsbilder erzeugt. Dieser Prozess wird iteriert. Schrittweise wird so die 3D-Struktur immer genauer bestimmt.

Different from 'normal' photography, electron microscopic images are lacking depth of focus that would allow depth perception and drawing conclusions on the three-dimensional arrangement of objects. Thus we need to employ a different strategy to determine the three-dimensional shape of a protein. For this, we rely on a technique that is, in slightly modified form, also employed for medical tomography: a series of two-dimensional images showing different views of the same object contains all the information necessary to compute a three-dimensional structure (figures 1,2).

Nevertheless, recent years have shown that there is not *the* single three-dimensional structure of a protein. Active proteins constantly change their three-dimensional arrangement. A prime example for this is the ribosome, translating our genetic code into the proteins that form our cells. We could recently demonstrate [1;2] that human ribosomes have an additional degree of conformational freedom compared to those from bacteria. Why could this be of interest? If we were to design antibiotics that act on this difference, we would open up a novel mechanism of targeting only bacterial ribosomes. Resulting drugs (now rationally designed) might help overcoming bacterial resistances that have begun to plague clinics in recent years.

References

- [1] Budkevich, T.V., Giesebrecht, J., Behrmann, E., Loerke, J., Ramrath, D.J.F., Mielke, T., Ismer, J., Hildebrand, P.W., Tung, C.-S., Nierhaus, K.H., *et al.* (2014) "Regulation of the Mammalian elongation cycle by subunit rolling: a eukaryotic-specific ribosome rearrangement" *Cell* 158, 121–131
- [2] Behrmann, E., Loerke, J., Budkevich, T.V., Yamamoto, K., Schmidt, A., Penczek, P. A., Vos, M.R., Bürger, J., Mielke, T., Scheerer, P. & Spahn, C.M.T. (2015) "Structural snapshots of actively translating human ribosomes" *Cell* 161, 845–857



Elektronenmikroskopie. Elektronenmikroskope funktionieren im Prinzip wie Lichtmikroskope, verwenden jedoch magnetische Linsen. Anstelle eines Lichtstrahls leitet man einen Elektronenstrahl durch die Probe und vergrößert das entstehende Bild. Da die Auflösungsgrenze von Elektronenmikroskopen in der atomaren Größenordnung liegt, sind diese bestens geeignet, um Proteine und Proteinkomplexe darzustellen.

Im Gegensatz zur „normalen“ Fotografie fehlt bei elektronenmikroskopischen Aufnahmen die Tiefen(un)schärfe, die Rückschlüsse auf die räumliche Anordnung zuließe. Wir benötigen also einen anderen Ansatz, um dreidimensionale Informationen zu erhalten. Dazu nutzen wir eine Methode, die in ähnlicher Form auch in der medizinischen Computertomographie zum Einsatz kommt: Aus mehreren zweidimensionalen Bildern kann man die dreidimensionale Struktur berechnen (Abbildung 1,2).

Es hat sich in den letzten Jahren jedoch gezeigt, dass es nicht *die* dreidimensionale Struktur eines Proteins gibt, denn aktive Proteine ändern ständig ihre räumliche Anordnung. Ein gutes Beispiel hierfür ist das menschliche Ribosom, das in unseren Zellen den genetischen Code in Proteine übersetzt. Wir konnten jüngst zeigen [1; 2], dass menschliche Ribosomen einen zusätzlichen Bewegungsfreiheitsgrad im Vergleich zu bakteriellen Ribosomen haben. Wieso ist das so interessant? Möglicherweise können wir durch diesen Unterschied neuartige Antibiotika entwerfen, die gezielt auf bakterielle Ribosomen wirken. Auf diese Weise können Strukturanalysen dabei helfen neue Medikamente zu entwickeln.

Literatur

[1] Budkevich, T.V., Giesebrecht, J., Behrmann, E., Loerke, J., Ramrath, D.J.F., Mielke, T., Ismer, J., Hildebrand, P.W., Tung, C.-S., Nierhaus, K.H., *et al.* (2014) "Regulation of the Mammalian elongation cycle by subunit rolling: a eukaryotic-specific ribosome rearrangement" *Cell* 158, 121–131

[2] Behrmann, E., Loerke, J., Budkevich, T.V., Yamamoto, K., Schmidt, A., Penczek, P. A., Vos, M.R., Bürger, J., Mielke, T., Scheerer, P. & Spahn, C.M.T. (2015) "Structural snapshots of actively translating human ribosomes" *Cell* 161, 845–857

Every single electron counts: The challenges of cryo-electron microscopy

Stephan Irsen

For a better understanding of the function of proteins knowing their supra-molecular structure inside the cell is crucial. Cryo-electron microscopy allows investigating frozen, hydrated samples at molecular resolution. Such analyzes are technically very demanding. A new type of direct-electron detectors with significantly increased sensitivity pushes the limits of cryo-electron microscopy.

All living organisms gather sensory information using specialized receptor molecules. Rhodopsin and guanylyl cyclase are two well-known examples for such receptors. Rhodopsin is a visual pigment while guanylyl cyclase is a chemical sensor. High sensitivity is typical for such receptor molecules. While guanylyl cyclase can detect single attractant molecules, Rhodopsin can sense single photons. To better understand the function of these receptors, analyzing their supramolecular structure inside the cell membrane is crucial [1].

Cryo-electron microscopy allows for analyzing biological samples with molecular resolution in a close to native state. Combining this technique with cryo-electron tomography, a series of 60 - 120 images can be used to generate a three-dimensional dataset of the sample – similar to computed tomography in medicine (also see: *Why do we need to know the structural dynamics of proteins? – On the quest for novel drugs*, by Elmar Behrmann in this annual report).

Figure 1 shows a cryo-electron tomogram of sea urchin sperm. The sperm was first vitrified – this means frozen without the formation of ice crystals - and afterwards analyzed in a cryo-transmission electron microscope (cryo-TEM). We aim to analyze the organization of the guanylyl cyclase inside the plasma membrane of the sperm flagellum.

Typical resolutions achievable by cryo-electron tomography are in the range of 5 nm. This is sufficient to image cell organelles or membranes. For analyzing the supramolecular organization of molecules inside the plasma membrane, the resolution of the reconstructed tomogram must be at least 2 nm. Depending on the sample this is difficult or even impossible using conventional camera systems. What are the reasons for such limitations? What possibilities exist, to enhance the resolution of cryo-electron tomography?

Contact

Stephan Irsen
 Research Center caesar
 Scientific Facility
 Elektronen Microscopy and Analytics
 Phone: +49 (0)228 9656-264
stephan.irsen@caesar.de

Jedes Elektron zählt: Die Herausforderungen der Kryo-Elektronenmikroskopie

Stephan Irsen

Kontakt

Stephan Irsen

Forschungszentrum caesar

Wissenschaftliche Facility

Elektronenmikroskopie und Analytik

Telefon: +49 (0)228 9656-264

stephan.irsen@caesar.de

Um die Funktion von Proteinen besser zu verstehen, ist es wichtig, ihre supramolekulare Struktur in der intakten Zelle zu kennen. Mithilfe der Kryo-Elektronenmikroskopie lassen sich gefrorene biologische Proben mit der nötigen molekularen Auflösung analysieren. Diese Untersuchungen stellen hohe Ansprüche an die Detektoren. Sogenannte Direkt-Elektronendetektoren ermöglichen Analysen mit bisher nicht erreichter Empfindlichkeit.

Lebewesen nehmen ihre Umwelt mithilfe von Rezeptormolekülen wahr. Zwei bekannte Beispiele für solche Rezeptormoleküle sind das Rhodopsin, ein Sehpigment, und die Guanylylzyklase, ein chemischer Sensor in vielen Tieren. Rezeptormoleküle zeichnen sich durch ihre extreme Empfindlichkeit aus: Rhodopsin kann einzelne Photonen erkennen, die Guanylylzyklase einzelne Lockstoffmoleküle. Um die Funktion dieser hochsensiblen Rezeptormoleküle besser zu verstehen, muss man untersuchen, wie diese Moleküle in der Zellmembran angeordnet sind [1].

Mit der Kryo-Elektronenmikroskopie kann man biologische Strukturen in einem lebensnahen Zustand untersuchen – bis in den molekularen Bereich hinein. Durch den Einsatz von Kryo-Elektronentomographie wird – ähnlich wie bei der Computertomographie in der Medizin – aus bis zu 120 Einzelbildern ein dreidimensionaler Datensatz der Probe rekonstruiert (siehe auch: *Wozu strukturelle Dynamik von Proteinen? – Auf der Suche nach neuen Medikamenten* von Elmar Behrmann in diesem Jahresbericht).

Abbildung 1 zeigt ein Kryo-Elektronentomogramm eines Seeigelspermiums. Dafür wurden Spermien eingefroren und in einem Kryo-Transmissionselektronenmikroskop (Kryo-TEM) analysiert. Wir wollten wissen, wie die Guanylylzyklase-Proteine in der Plasmamembran des Spermiumschwanzes angeordnet sind.

Typischerweise lässt sich mit der Kryo-Elektronentomographie eine Auflösung von ca. 5 Nanometern erreichen. Dies reicht aus, um Zellorganellen und Membranen abzubilden. Möchte man jedoch supramolekulare Strukturen analysieren, benötigt man eine Auflösung von zwei Nanometern oder besser. Es ist – je nach Probe – schwierig bis unmöglich, dies mit konventionellen Kameras zu erreichen. Woran liegt das? Und welche Möglichkeiten gibt es, die Auflösung der Kryo-Elektronentomographie weiter zu verbessern?

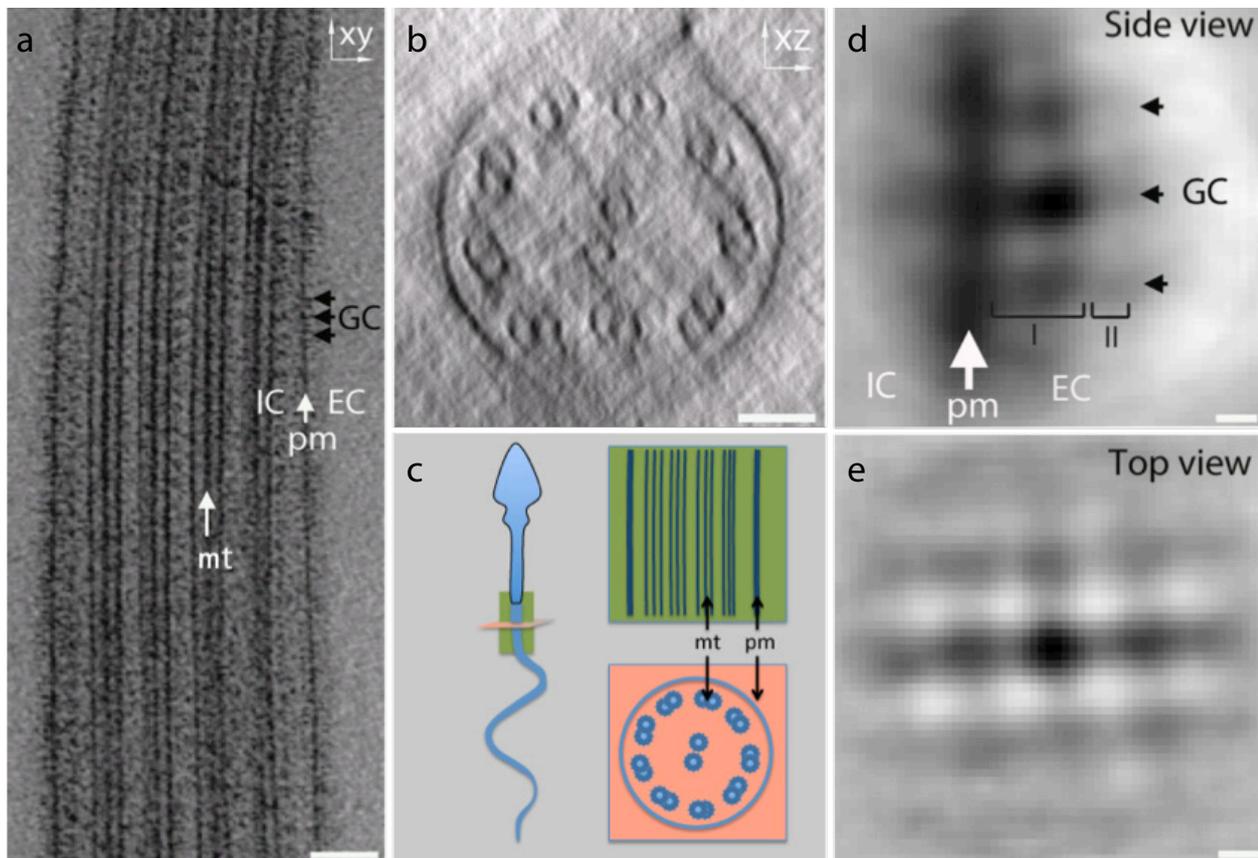


Figure 1: Cryo-electron tomogram of sea-urchin sperm. Three-dimensional arrangement of guanylyl cyclase (GC) inside the plasma membrane. **a, b, c.** Tomographic slices of a sea urchin sperm. Longitudinal section (a) and cross-section. (b). The following details can be seen: microtubules (mt), Plasma membrane (pm), and extra- and intracellular region (EC / IC). **d and e.** Potential GC-molecules become visible after subtomogram averaging.

Limits of cryo-electron microscopy

Modern transmission-electron microscopes achieve resolutions of 1 Ångstrom or below (1 Å = 0.1 nm, this is the ten millionth part of one millimeter). This is sufficient to image the atomic structure of many materials. But why is it so difficult to use frozen samples? The vitrified, amorphous ice of these samples is extremely sensitive and reacts with the electrons used in a TEM. The maximum electron dose that can be applied to such a sample is approximately 50 – 70 e/Å². Figure 2 demonstrates this clearly. At a dose of 75 e/Å² (figure 2, b and d) bubbles occur inside the ice layer; the sample (here a tobacco mosaic virus) is irreversibly changed or even destroyed.

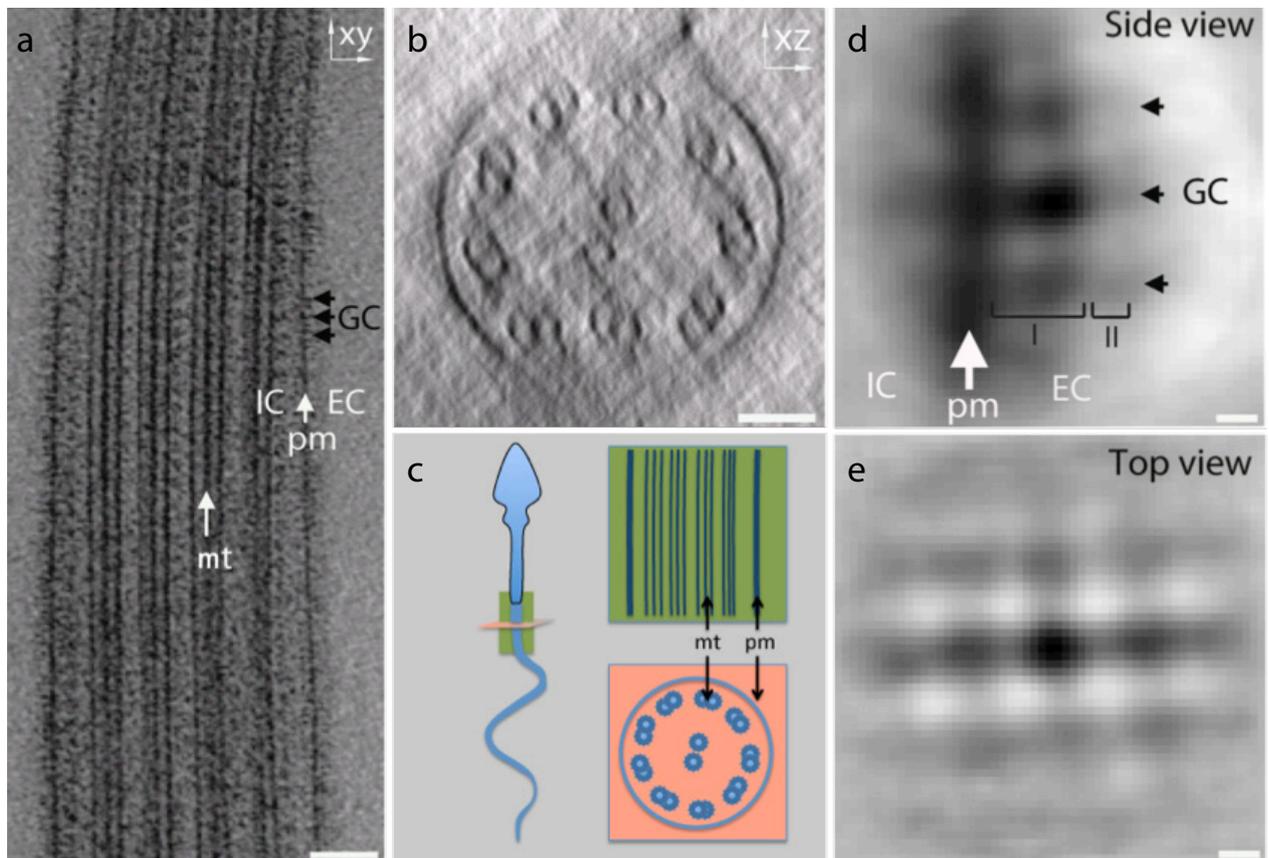


Abbildung 1: Kryo-Elektronentomogramm von Seeigelspermien. Dreidimensionale Anordnung von Guanylylzyklase-Molekülen (GC) in der Plasmamembran. **a, b, c.** Tomographische Schnitte eines Seeigelspermiums. Längsschnitt (a) und Querschnitt (b). Folgende Details lassen sich erkennen: die Mikrotubuli (mt), die Plasmamembran (pm) sowie die extra- und intrazelluläre Region (EC / IC). **d. und e.** Potentielle GC-Moleküle werden nach der Mittelung der Subtomogramme (*subtomogram averaging*) sichtbar.

Grenzen der Kryo-Elektronenmikroskopie

Moderne Elektronenmikroskope können Proben mit einer Auflösung von 1 Ångström ($1 \text{ \AA} = 0,1 \text{ nm}$, also ein Zehnmillionstel von einem Millimeter!) und besser abbilden. Das genügt, um die atomare Struktur vieler Materialien sichtbar zu machen. Wo liegt dann das Problem bei der Analyse gefrorener biologischer Proben? Das amorphe Eis von Kryo-Proben ist sehr empfindlich und reagiert mit den Elektronen im Elektronenmikroskop. Daher ist die Dosis, mit der solche Proben bestrahlt werden können, streng limitiert. Abbildung 2 zeigt diesen Effekt sehr deutlich. Bei einer Bestrahlung mit $75 \text{ e}/\text{\AA}^2$ (Abbildung 2, b und d) bildet das Eis Blasen und die Probe (hier ein Tabakmosaikvirus) verändert sich irreversibel oder wird sogar zerstört.

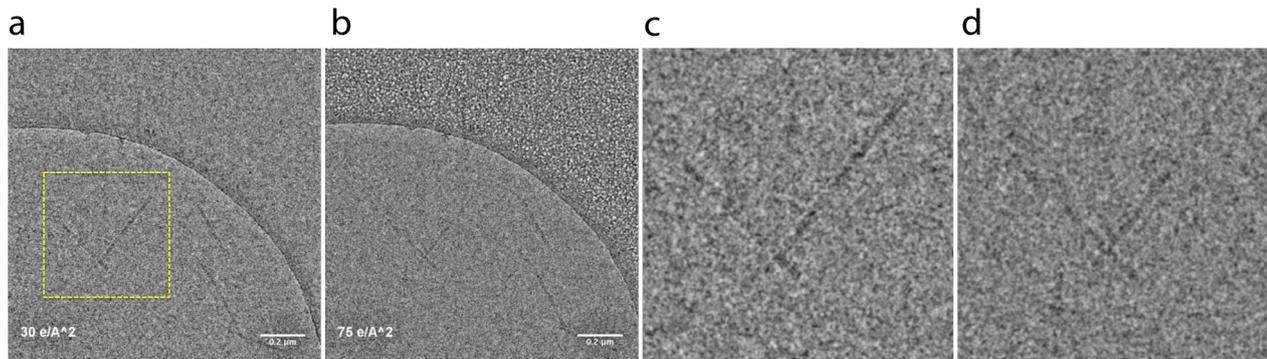


Figure 2: Effect of electron radiation on a cryo-sample. Cryo-samples change on exposition to the electron beam. The figures show micrographs of tobacco mosaic virus, recorded in a cryo-transmission electron microscope. **a and c.** Micrograph recorded after an electron dose of $30 \text{ e}/\text{\AA}^2$. **b and d.** Micrograph of the same sample after an applied electron dose of $75 \text{ e}/\text{\AA}^2$. Changes in the ice layer and of the sample are visible.

The maximum dose of approximately $50 \text{ e}/\text{\AA}^2$ that can be applied to a cryo sample is 20 – 30 times lower compared to the dose that can be applied to samples at room temperature. This leads to a very high noise in the micrographs of such cryo samples.

Figure 3 (a,b) shows images of the caesar building with a simulated electron dose of $500 \text{ e}/\text{\AA}^2$ (a, normal TEM-conditions for room temperature samples) and a dose of $30 \text{ e}/\text{\AA}^2$ (b, condition for cryo-TEM). Unfortunately, the noise in such micrographs is not the only problem. Cryo samples are so-called weak phase objects. They are typically composed only from light elements, e.g carbon, hydrogen, and oxygen. Here, image contrast is not generated by scattering of electrons at heavy elements, which is one of the main contrast generating mechanisms in transmission electron microscopy and

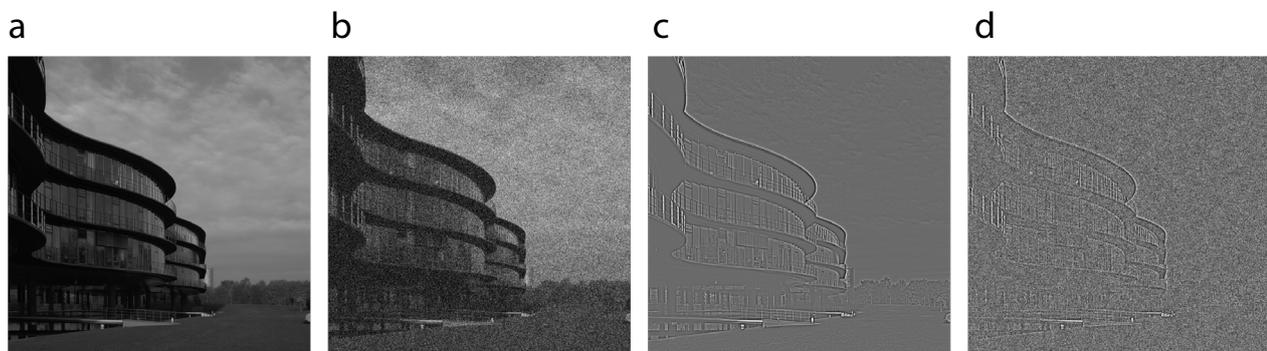


Figure 3: Simulation of cryo-TEM images. **a.** Image of the caesar building showing an image contrast comparable to a standard TEM image. **b.** The same image as in a with a simulated dose comparable to cryo-TEM. **c and d.** Simulated images of the caesar building as a weak phase object at $500 \text{ e}/\text{\AA}^2$ (c) and $30 \text{ e}/\text{\AA}^2$ (d).

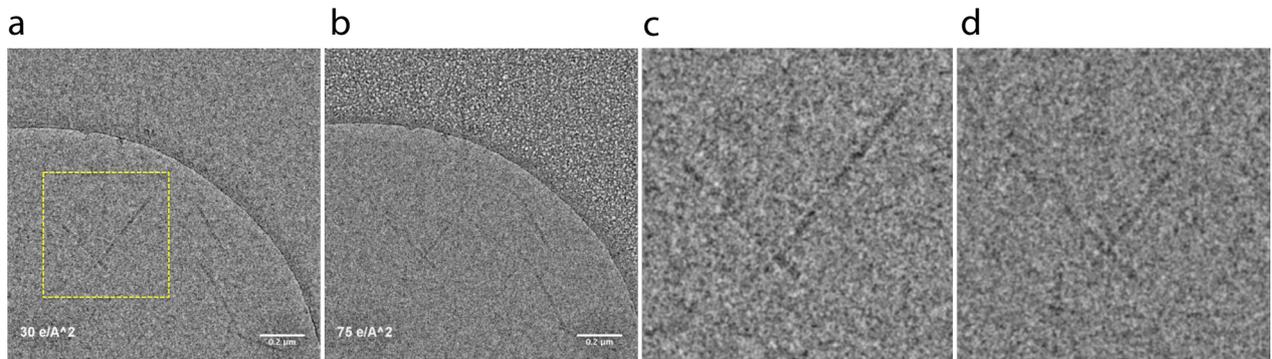


Abbildung 2: Einfluss von Elektronen auf eine Kryo-Probe. Kryo-Proben verändern sich, wenn sie dem Elektronenstrahl ausgesetzt ist. Die Abbildungen zeigen Mikrographen des Tabakmosaikvirus, die mit einem Kryo-Transmissionselektronenmikroskop aufgenommen wurden. **a. und c.** Aufnahme mit einer Bestrahlung von 30 Elektronen/Å². **b. und d.** Mikrographen derselben Probenstelle nach einer Bestrahlung mit 75 Elektronen/Å². Die Veränderungen im Eis (b) und in der Probe (d) sind gut zu erkennen.

Die maximale Dosis, die eine Kryo-Probe üblicherweise verträgt, liegt bei ca. 50 e/Å². Das ist ungefähr 20 bis 30 mal weniger als bei nicht gefrorenen Proben. Durch diese sehr niedrige Elektronendosis ist das Rauschen in den Mikrographen sehr stark.

Abbildung 3 (a, b) zeigt das caesar Gebäude mit einer simulierten Elektronendosis von 500 e/Å² (a, normale TEM-Bedingungen) und einer Dosis von 30 e/Å² (b, Kryo-TEM-Bedingungen). Die deutliche Zunahme des Bildrauschens ist jedoch nicht das einzige Problem. Hinzu kommt: Kryo-Proben sind sogenannte schwache Phasenobjekte. Sie bestehen normalerweise nur aus leichten Elementen, wie beispielsweise Kohlenstoff, Wasserstoff und Sauerstoff. Das bedeutet, dass der Bildkontrast nicht – wie sonst in der Transmissionselektronenmikroskopie – durch Streuung der Elektronen an

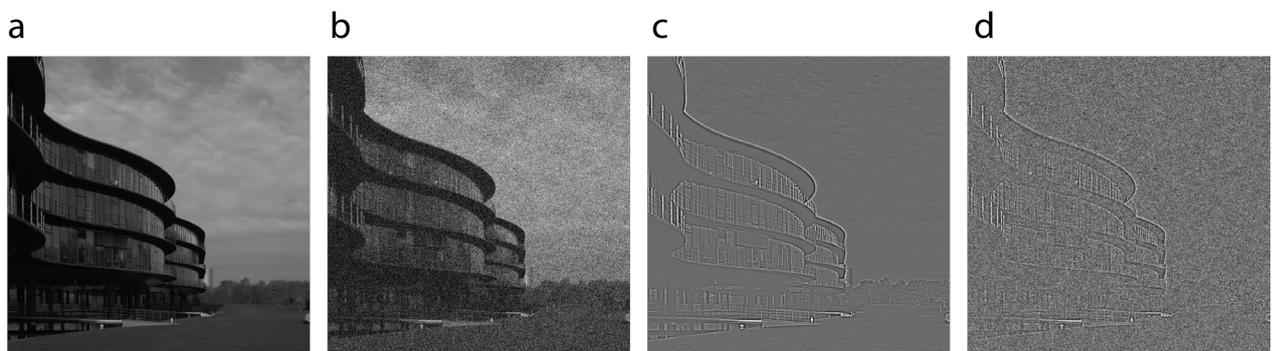


Abbildung 3: Simulation von Kryo-TEM-Bildern. **a.** Das caesar-Gebäude mit dem Kontrast eines typischen TEM-Mikrographen. **b.** Dasselbe Bild mit einer Dosis, wie bei der Kryo-Elektronenmikroskopie. **c. und d.** Das caesar-Gebäude als schwaches Phasenobjekt (Kryo-Probe) mit 500 e/Å² (c) und 30 e/Å² (d).

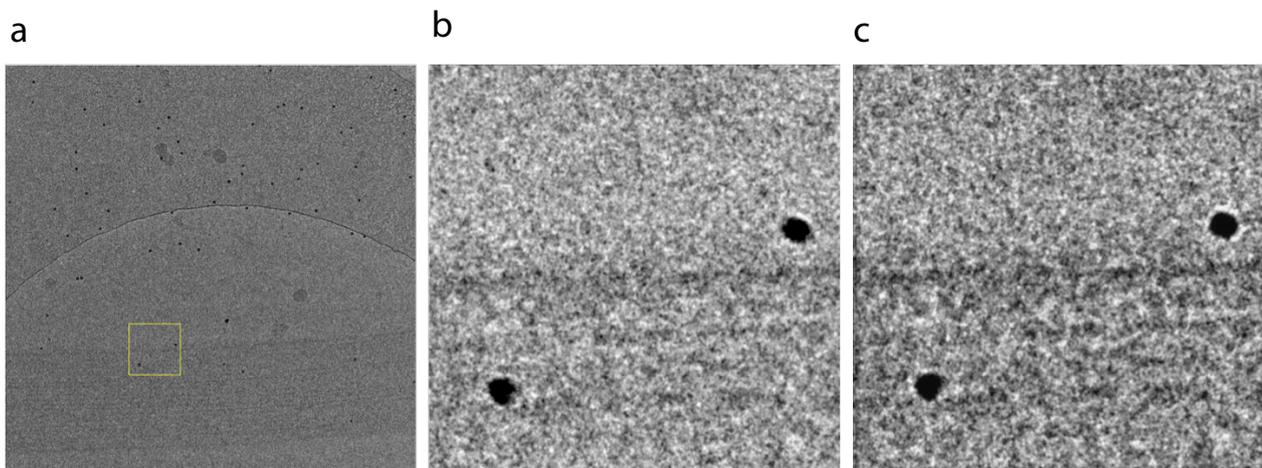


Figure 4: Movies instead of images. Using modern DEDs allows recording image sequences up to 400 frames/s. **a.** TEM-micrograph of the flagellum of a sea-urchin sperm, composed of 90 single frames. **b. and c.** Magnified region from (a); without (b) and with (c) drift correction.

is called amplitude contrast. In weak phase objects, contrast is generated by a phase shift of the electron's wave function inside the sample and is much lower compared to amplitude contrast. Figure 3c gives an impression of the caesar building as weak phase object. Adding the typical noise of a image at cryo-conditions leads to the situation shown in figure 3d. Now it is obvious, why a sensitive detector is so important. Proverbially, no electron can be lost.

The human eye fulfills this task perfectly. In the dark, every single photon is detected and transferred into a signal. A conventional camera inside a TEM on the other hand needs 3 – 10 electrons to generate a distinct signal. Recently, a new generation of detectors has been developed, specially designed for the low dose conditions of cryo-TEM. These so called direct-electron detectors (DED) are up to five times more sensitive compared to conventional cameras. Caesar possesses such a DED (Falcon II, FEI).

Films instead of images

The improved sensitivity of DEDs comes along with improved read-out electronics. This allows frame rates of up to 400 frames/s [2]. DEDs can record movies instead of integrated images. Using such movies, sample drift, which typically occurs over the illumination process of 1-5 s, can be corrected. Figure 4 shows the flagellum of a sea urchin sperm without (b) and with (c) drift correction. The improved image quality of the corrected image can easily be recognized.

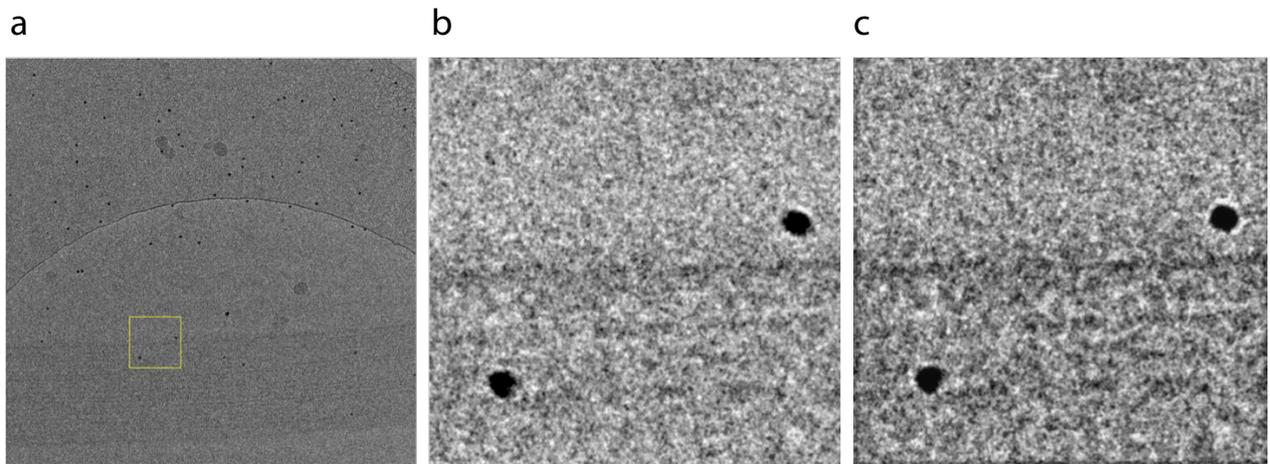


Abbildung 4: Filme statt Bilder. Mit modernen DEDs können Bildsequenzen mit bis zu 400 Bildern pro Sekunde aufgenommen werden. **a.** TEM-Mikrograph eines Spermiolenflagellums, erzeugt aus 90 Einzelbildern. **b. und c.** Bildausschnitt aus (a); ohne (b) und mit (c) Driftkorrektur.

schweren Elementen in der Probe entsteht, sondern nur durch eine sogenannte Phasenverschiebung. Der so erzeugte Kontrast ist sehr viel schwächer. Abbildung 3c zeigt, wie das caesar-Gebäude als schwaches Phasenobjekt aussehen würde. Addiert man dazu noch das Rauschen aufgrund der niedrigen Dosis unter Kryo-Bedingungen (Abbildung 3d), so wird deutlich, wie wichtig ein guter Bilddetektor in einem Kryo-TEM ist. Man darf sprichwörtlich kein einziges Elektron verlieren!

Unsere Augen erfüllen diese Aufgabe hervorragend; sie können einzelne Photonen detektieren und in ein elektrisches Signal umwandeln. Eine konventionelle Kamera in einem TEM benötigt 3 bis 10 Elektronen, um ein eindeutiges Signal zu erzeugen. In den letzten Jahren hat allerdings eine neue Generation von Detektoren den Einzug in die Kryo-Elektronenmikroskopie gefunden: die sogenannten Direkt-Elektronendetektoren (DED). Caesar besitzt einen solchen DED (Falcon II, FEI). DEDs sind bis zu fünfmal empfindlicher als konventionelle Kameras.

Filme statt Bilder

Die höhere Empfindlichkeit und eine verbesserte Ausleselektronik von DEDs erlauben Bildraten von bis zu 400 Bildern pro Sekunde [2]. Ein DED ermöglicht somit die Aufnahme von Filmen anstelle von einzelnen Bildern. Bewegungen der Probe während der Aufnahme können korrigiert werden (Driftkorrektur). Abbildung 4 zeigt das Flagellum eines Seeigelspermiums ohne (b) und mit (c) Driftkorrektur. Die deutliche Verbesserung der Qualität des drift-korrigierten Bildes ist gut zu erkennen.

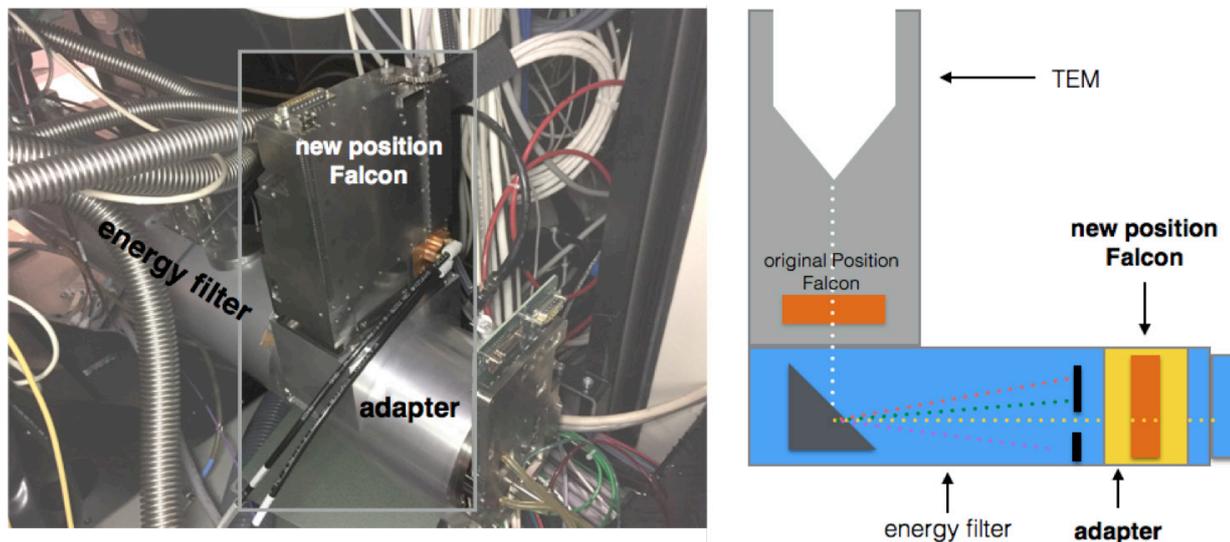


Figure 5: Combination of a Falcon-DED and a Gatan imaging filter (GIF). The left image shows the new position of the Falcon-DED behind the GIF. The original GIF-camera is kept in its original position.

Filtered images

In samples with a thickness of more than 100 nm, a significant part of the electrons loses some of its energy inside the sample due to inelastic scattering. These electrons are focused into a different plane compared to the elastically scattered normal electrons. This results in blurred images. The effect increases with the sample thickness. Many TEMs possess an optical element called energy-filter (GIF = Gatan imaging filter) to remove the inelastically scattered electrons from the final image. This leads to sharp images on cost of electrons that contribute to the image. In cryo-TEM, such energy-filtered images sometimes suffer from noise in a way, that the image signal cannot be extracted anymore. Here, DEDs are very promising to push energy-filtered cryo- electron microscopy.

For the first time, we were able to combine a Falcon-DED and a GIF. Therefore, we changed the original position of the Falcon-DED inside the TEM (figure5). The DED gives the necessary sensitivity; the energy-filter enhances the image definition – a strong combination. For the first time, we were able to record and reconstruct energy-filtered tomograms with a cumulative dose of $30 \text{ e}/\text{\AA}^2$.

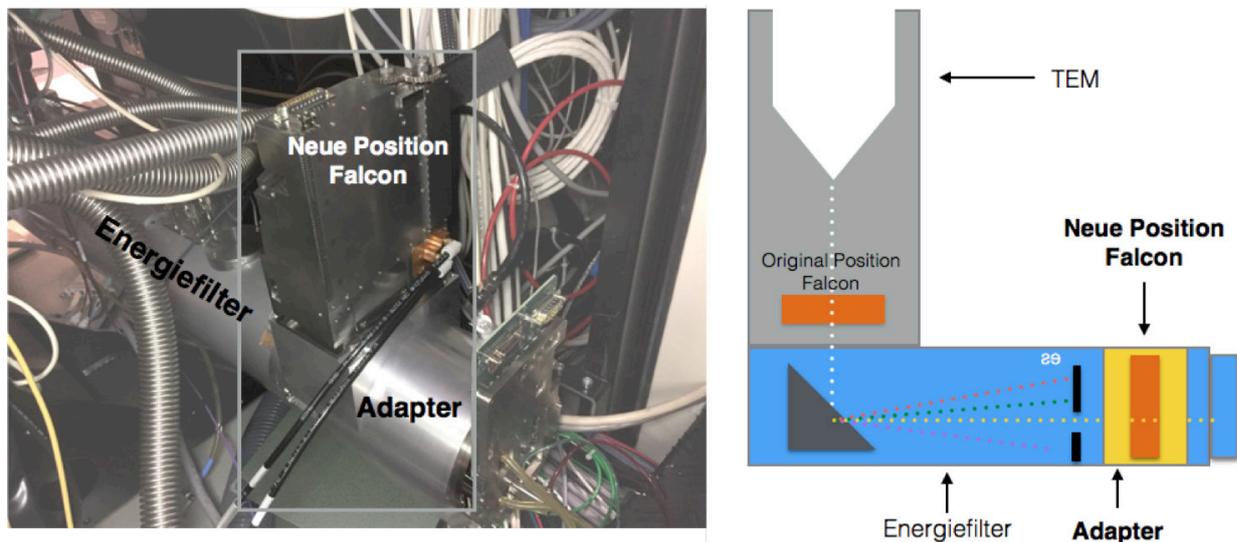


Abbildung 5: Kombination eines Falcon-DED mit einem Gatan Imaging Filter (GIF). Links ist die neue Position des Falcon-DED gezeigt. Das rechte Bild zeigt den Falcon-DED an seiner neuen Position hinter dem GIF. Die ursprüngliche GIF-Kamera bleibt erhalten.

Gefilterte Bilder

Bei der Untersuchung von Proben mit einer Dicke von mehr als 100 nm verändert ein Teil der Elektronen nach einer inelastischen Wechselwirkung mit der Probe seine Energie. Diese Elektronen haben eine andere Fokusebene als elastisch gestreute Elektronen. Das Ergebnis: Die Bilder werden unscharf. Viele Transmissionselektronenmikroskope besitzen einen Energiefilter (GIF = *Gatan Imaging Filter*), der die inelastisch-gestreuten Elektronen herausfiltert. Diese Elektronen stehen im Bild nicht mehr zur Verfügung. Das wirkt sich vor allem dann nachteilig aus, wenn man Kryo-Proben untersucht, bei denen der Kontrast niedrig ist. Nach dem Filtern ist das Bildsignal mitunter so schwach, dass es nicht mehr vom Rauschen getrennt werden kann; Untersuchungen wie die Kryo-Tomographie sind dann nicht mehr möglich. Hier sind DEDs mit ihrer höheren Empfindlichkeit besonders vielversprechend.

Es ist uns erstmals gelungen, einen Falcon-DED mit einem GIF zu kombinieren. Wir haben dazu die ursprüngliche Position des Falcon-DED im Elektronenmikroskop verändert (Abbildung 5). Der DED sorgt für die Empfindlichkeit, der Energiefilter (GIF) für die Bildschärfe – ein starkes Paar! Erstmals konnten so energiegefilterte Tomogramme mit einer kumulierten Elektronendosis von 30 Elektronen/Å² erfolgreich aufgenommen werden.

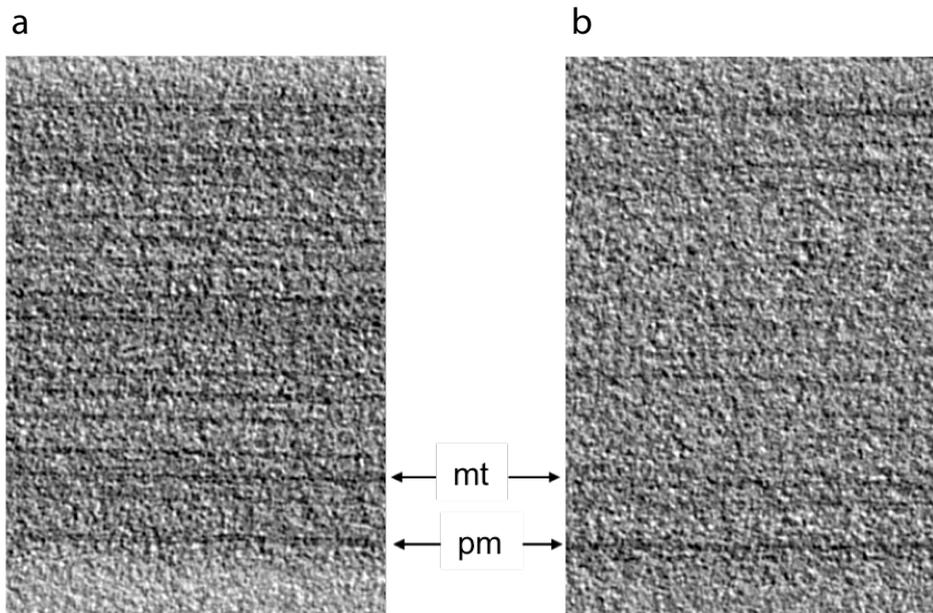


Figure 6: Effect of an energy-filter on micrographs recorded with DED. Tomographic slices through the flagellum of a sea-urchin sperm with (a) and without (b) energy-filter (mt: microtubules; pm: plasma membrane)

These first recordings demonstrate the significantly improved tomogram quality due to the DED/GIF combination (Figure 6). At the same electron dose the DED images show more details, microtubules show stronger contrast, plasma membranes are better resolved. A quantitative analysis will give details about how far the resolution can be pushed by this DED/GIF combination.

References

- [1] Gunkel, M., Schöneberg, J., Alkhalidi, W., Irsen, S., Noé, F., Kaupp, U.B. & Al-Amoudi, A. (2015) "Higher-order architecture of rhodopsin in intact photoreceptors and its implication for phototransduction kinetics" *Structure*, doi:10.1016/j.str.2015.01.015
- [2] Li, X. *et al.* (2013) "Electron counting and beam-induced motion correction enable near-atomic-resolution single-particle cryo-EM" *Nat. Meth.* 10, 584–590

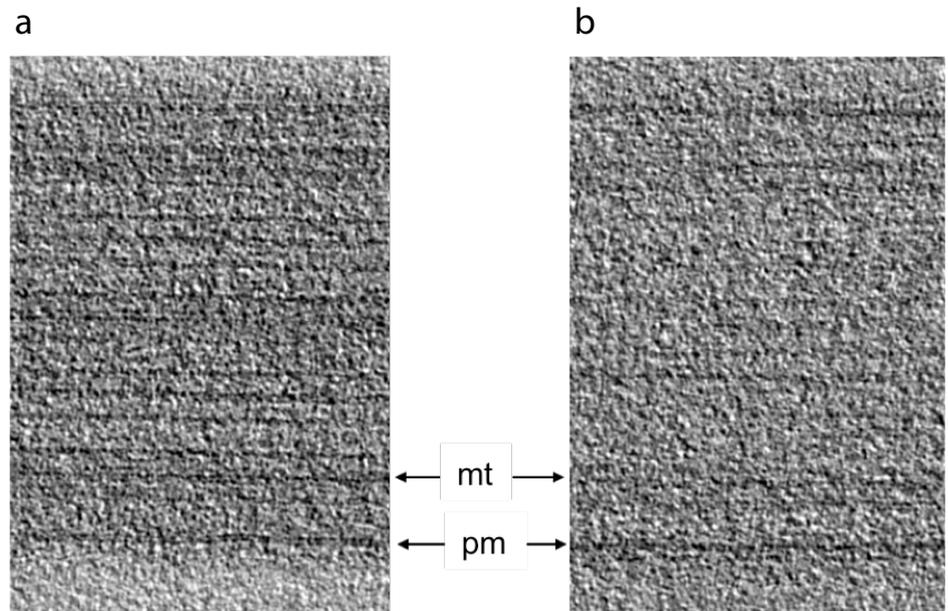


Abbildung 6: Der Einfluss eines Energiefilters bei DED-Aufnahmen. Tomographische Schnitte eines Seeigelspermiums mit (a) und ohne (b) Energiefilter (mt: Mikrotubuli; pm: Plasmamembran).

Schon diese ersten Aufnahmen zeigen die deutlich verbesserte Qualität der Tomogramme, die mit der neuen Kombination DED/GIF aufgenommen wurden (Abbildung 6). Es sind bei gleicher Elektronendosis mehr Details in den Bildern zu erkennen. Die Mikrotubuli zeigen einen besseren Kontrast, die Plasmamembran ist besser aufgelöst. Eine quantitative Auswertung wird zeigen, wie hoch der Auflösungsgewinn durch diese Maßnahmen tatsächlich ist.

Literatur

[1] Gunkel, M., Schöneberg, J., Alkhaldi, W., Irsen, S., Noé, F., Kaupp, U.B. & Al-Amoudi, A. (2015) "Higher-order architecture of rhodopsin in intact photoreceptors and its implication for phototransduction kinetics" *Structure*, doi:10.1016/j.str.2015.01.015

[2] Li, X. *et al.* (2013) "Electron counting and beam-induced motion correction enable near-atomic-resolution single-particle cryo-EM" *Nat. Meth.* 10, 584–590



Berichte über abgeschlossene Doktorarbeiten

Ph.D. reports

A light switch for sperm

Vera Jansen

Optogenetics allows to manipulate cells by light. Using this technique, cells are genetically modified to produce light-sensitive proteins. One of these proteins is the photo-activated adenylate cyclase bPAC. It allows to control the synthesis of the intracellular messenger cAMP by light. In my Ph.D. thesis, I introduced bPAC into mouse sperm in order to manipulate sperm function by light.

To analyze the complex signal processing that takes place inside cells it is necessary to manipulate cellular signaling with high temporal and spatial precision. Light is particularly well suited to this task, as it can be switched on and off quickly and does not affect the regular signal processing of a cell. Using optogenetics, cells are genetically modified to produce light-sensitive proteins and, thereby, become susceptible to light. The most widely used optogenetic tools are the so-called channelrhodopsins. These light-activated ion channels from the green algae *Chlamydomonas* were first identified in 2002, and are a well-established tool in neuroscience: the activity of neurons expressing channelrhodopsins can be precisely triggered by light. In addition to the membrane potential, other signaling events within a cell can be manipulated using light. Photo-activated adenylate cyclases (PACs) synthesize the intracellular messenger 3'-5'-cyclic adenosine monophosphate (cAMP). One member of this protein family is bPAC, from the bacterium *Beggiatoa*, which was discovered in Peter Hegemann's laboratory at the Humboldt University in Berlin.

With my first experiments, I determined whether the concentration of intracellular cAMP in HEK293 cells could be manipulated with bPAC. HEK293 is a cell line derived from human embryonic kidney cells and has been used as a model system in cell biology research for many years. I generated cells expressing bPAC together with a cAMP-gated ion channel. An increase in intracellular cAMP opens the ion channel, allowing calcium ions to enter the cell (figure 1a). This calcium influx can be visualized by fluorescent indicators. bPAC only remains active as long as the light is switched on; when it is switched off, the cAMP concentration declines (figure 1b). The amplitude of the cAMP signal can be regulated by the duration of the light pulse: more light produces more cAMP (figure 1c).

bPAC is therefore well-suited to manipulate the intracellular cAMP concentration by light. But is it also possible to use bPAC as an optogenetic tool *in vivo*?

Contact

Vera Jansen

Research Center caesar

Max Planck Research Group

Molecular Physiology

Phone: +49 (0)228 9656-206

vera.jansen@caesar.de

Ein Lichtschalter für Spermien

Vera Jansen

Kontakt

Vera Jansen

Forschungszentrum caesar

Max-Planck-Forschungsgruppe

Molekulare Physiologie

Telefon: +49 (0)228 9656-206

vera.jansen@caesar.de

Zellen lassen sich durch Licht steuern. In der Optogenetik werden Zellen gentechnisch so verändert, dass sie lichtempfindliche Proteine herstellen und damit auf Licht reagieren können. Ein solches Protein ist die lichtaktivierbare Adenylatzyklase bPAC, mit deren Hilfe man die Synthese des intrazellulären Botenstoffs cAMP steuern kann. In meiner Doktorarbeit habe ich bPAC in Mauspermien eingesetzt und so die Funktion von Spermien mit Licht manipulieren können.

Um die komplexen Signalverarbeitung innerhalb einer Zelle zu untersuchen, muss man Zellen mit hoher räumlicher und zeitlicher Präzision manipulieren können. Licht ist dazu besonders geeignet, da es schnell an- und abgeschaltet werden kann und nicht in die natürliche Signalverarbeitung der Zelle eingreift. In der Optogenetik werden gezielt lightsensitive Proteine in Zellen verpflanzt; die Zelle kann mit Licht gesteuert werden. Häufig kommen die sogenannten Channelrhodopsine zum Einsatz. Diese lichtaktivierbaren Ionenkanäle aus der Grünalge *Chlamydomonas* wurden 2002 zum ersten Mal beschrieben und werden mittlerweile vor allem in den Neurowissenschaften verwendet: Neurone, die Channelrhodopsine exprimieren, lassen sich mit Licht präzise anschalten. Neben dem Membranpotential einer Zelle lassen sich aber mittlerweile auch andere Signalwege in der Zelle mit Licht steuern. So wurden lichtaktivierte Adenylatzyklasen (*photoactivated adenylate cyclase*; PAC) gefunden, die den Botenstoff zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP) synthetisieren. Eine solche lichtaktivierte Adenylatzyklase ist bPAC aus dem Bakterium *Beggiatoa*, die in der Arbeitsgruppe von Peter Hegemann an der Humboldt-Universität in Berlin entdeckt wurde.

Ich habe zunächst untersucht, ob sich mit bPAC die intrazelluläre cAMP-Konzentration in HEK293-Zellen steuern lässt. HEK293 ist eine embryonale Nierenzelllinie, die in der Zellbiologie seit Jahrzehnten als Modellsystem verwendet wird. Ich habe bPAC zusammen mit einem cAMP-gesteuerten Ionenkanal in diese Zellen verpflanzt. Erhöht sich die cAMP-Konzentration in der Zelle, wird der Ionenkanal geöffnet und Kalziumionen strömen in die Zelle (Abbildung 1a). Dieser Kalziumstrom kann mit fluoreszierenden Indikatoren sichtbar gemacht werden. bPAC bleibt nur so lange aktiv, wie das Licht eingeschaltet bleibt; wenn das Licht ausgeschaltet wird, sinkt die cAMP-Konzentration wieder ab (Abbildung 1b). Auch die Amplitude des cAMP-Signals kann durch die Belichtungsdauer reguliert werden: mehr Licht produziert mehr cAMP (Abbildung 1c).

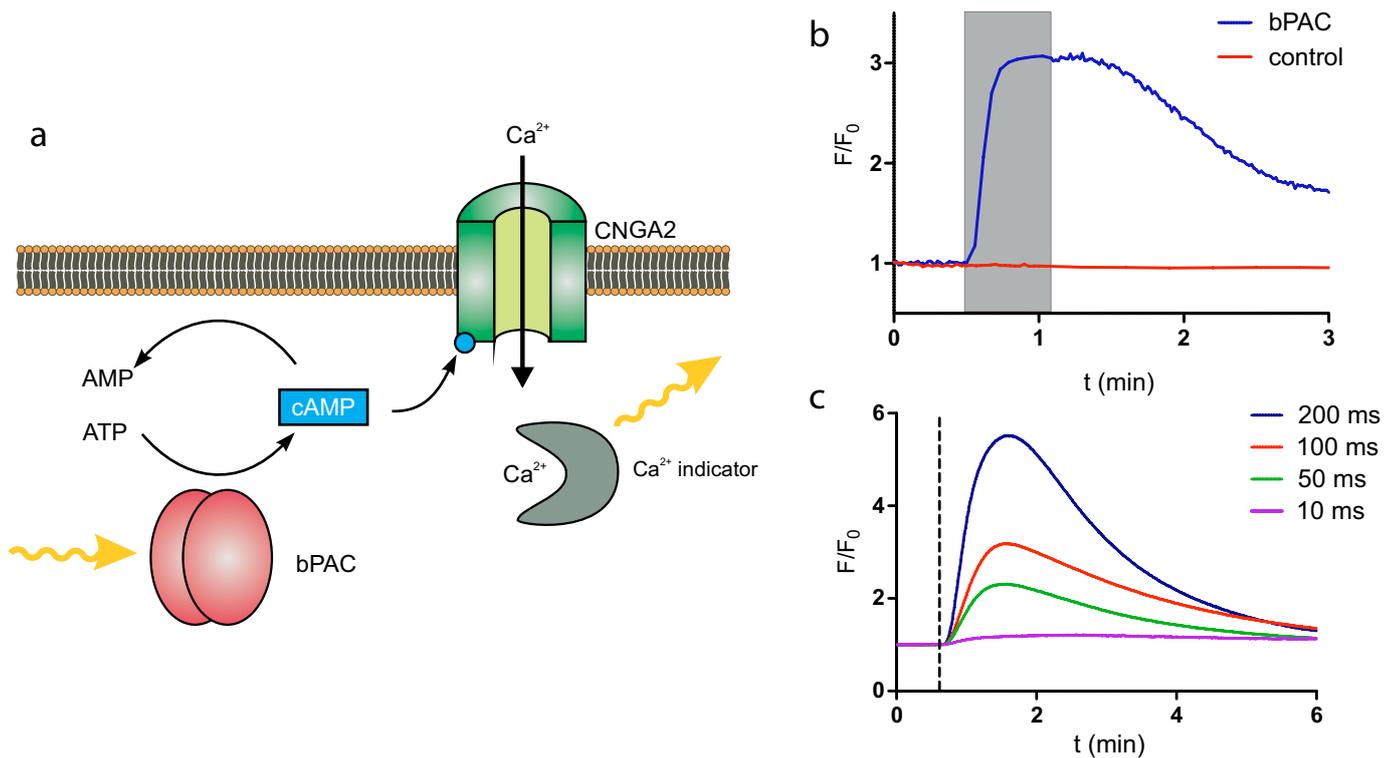


Figure 1: a. Assay to analyze the intracellular cAMP concentration. Opening of the CNG channel by cAMP causes an influx of calcium (Ca^{2+}) into the cell. Fluorescent indicators convert this increase in calcium into a light signal. **b.** Light stimulation (gray bar) of cells expressing bPAC causes cAMP synthesis. In non-bPAC cells (control) cAMP levels do not change upon light stimulation. **c.** The amplitude of a light-induced cAMP signal can be regulated by the exposure time.

cAMP is a common cellular messenger that controls a whole range of important physiological processes. In particular, it is indispensable for sperm function: cAMP regulates sperm development, maturation, and motility. cAMP synthesis in sperm is controlled by the SACY enzyme – a soluble adenylate cyclase regulated by bicarbonate (HCO_3^-). However, the cAMP-dependent signaling processes that occur in sperm are poorly understood.

Analyzing cAMP-dependent processes in sperm is hindered by the fact that pharmacological substances used to manipulate cAMP give rise to unwanted

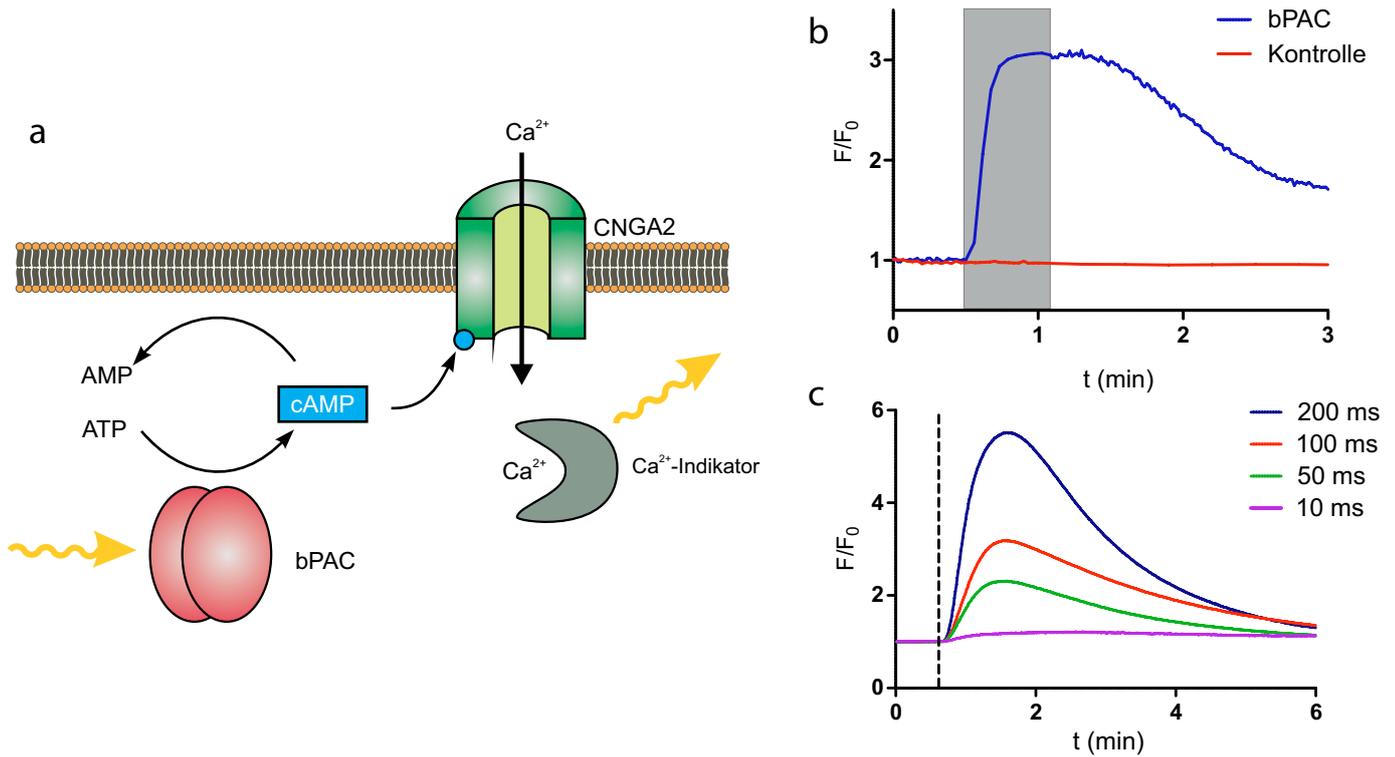


Abbildung 1: a. Ein Assay zur Analyse der intrazellulären cAMP-Konzentration. Die Kanalöffnung durch cAMP bewirkt einen Einstrom von Kalzium (Ca^{2+}) in die Zelle. Fluoreszierende Indikatoren übersetzen diesen Kalziumanstieg in ein Lichtsignal. b. Werden bPAC-exprimierende Zellen mit Licht stimuliert (grauer Balken), wird cAMP synthetisiert. In Zellen ohne bPAC (Kontrolle) verändert sich die cAMP-Konzentration nicht. c. Die Amplitude des cAMP-Signals lässt sich über die eingestrahelte Lichtdosis regulieren.

bPAC ist also ein geradezu ideales Werkzeug, um die cAMP-Konzentration mit Licht zu manipulieren. Doch kann man bPAC auch *in vivo* einsetzen?

cAMP ist ein vielseitiger Botenstoff, der eine ganze Reihe von wichtigen physiologischen Vorgängen kontrolliert. Auch in Spermien ist cAMP von essenzieller Bedeutung: Es reguliert unter anderem die Entwicklung und Reifung der Spermien, sowie die Motilität. Die cAMP-Synthese wird in Spermien durch das Enzym SACY reguliert, eine lösliche Adenylatzyklase, die durch Bicarbonat (HCO_3^-) reguliert wird. Die cAMP-abhängigen Signalwege, die in Spermien ablaufen, sind bisher

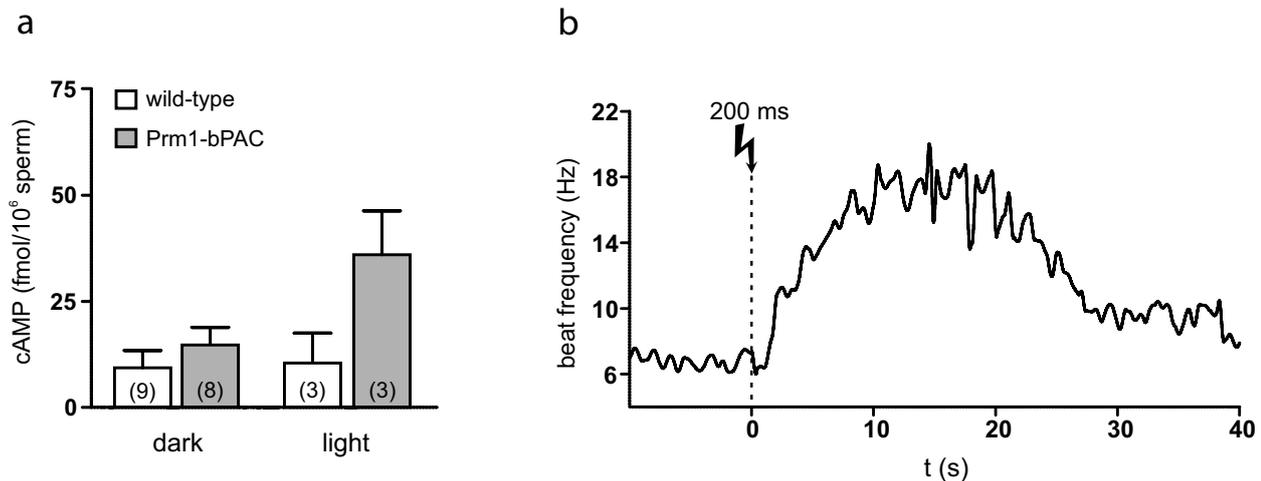


Figure 2: **a.** Sperm were prepared under red light (dark) to avoid bPAC activation. When the sperm samples were illuminated with a halogen lamp (light), the cAMP concentration in transgenic sperm increased. In wild-type sperm, cAMP concentration were not affected by light. The numbers in parentheses indicate the number of experiments. **b.** The flagellar beat frequency of a single bPAC sperm cell was recorded. Stimulating the sperm with a flash of UV light (dotted line) caused the sperm to beat faster. This effect is reversible: bPAC deactivates in the absence of light.

side effects. Optogenetics allows to analyze these signaling events without side effects. Therefore, I generated a transgenic mouse line, which expresses bPAC in sperm. In sperm of these mice cAMP synthesis is activated by light (figure 2a). An increase in cAMP accelerates the flagellar beat of sperm. In bPAC sperm, the flagellar beat can be directly controlled by light: A single 200-millisecond light pulse is sufficient to increase the flagellar beat frequency (figure 2b).

The importance of cAMP for sperm function is illustrated by the knockout mouse model *sNHE-KO*, which lacks active SACY. In sperm of *sNHE-KO* males, cAMP synthesis is abolished. Their sperm are unable to move; therefore the *sNHE-KO* males are infertile. To restore the motility in sperm by light, I crossed the *sNHE-KO* mice with bPAC mice.

In the dark, sperm of these double-transgenic mice are immotile as well. However, light stimulation restores the flagellar beating and the sperm starts to swim (figure 3a). I also could restore fertilization in *sNHE-KO*/bPAC mice *in vitro* using light. In this experiment, sperm and egg cells are incubated together and the number of fertilized eggs (two-cell stages) is determined. In the dark, no two-cell stages are

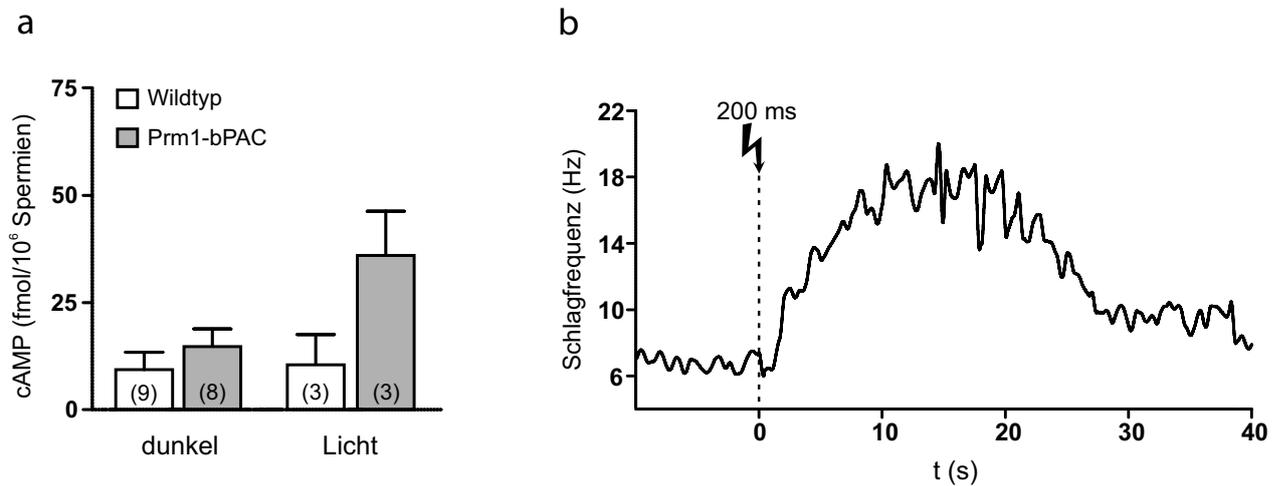


Abbildung 2: a. Spermien wurden unter rotem Licht präpariert, um bPAC nicht zu aktivieren (dunkel). Wurden die Spermienproben anschließend mit einer Halogenlampe belichtet (Licht), stieg in transgenen Spermien die cAMP-Konzentration an. In Wildtyp-Spermien veränderte sich die cAMP-Konzentration durch Belichtung nicht. Zahlen in Klammern bezeichnen die Anzahl der durchgeführten Experimente. b. Die flagellare Schlagfrequenz eines einzelnen transgenen Spermiums wurde am Mikroskop aufgezeichnet. Wurde das Spermium mit einem Lichtblitz aus einer UV-LED stimuliert (gestrichelte Linie), schlägt das Spermium schneller. Dieser Effekt ist reversibel, da bPAC ohne durchgehende Belichtung wieder inaktiviert.

nur unvollständig verstanden. Die Erforschung dieser Signalwege wird dadurch erschwert, dass der Einsatz von pharmakologischen Werkzeugen zur Manipulation von cAMP zu ungewollten Nebeneffekten führt. Solche Laborartefakte erschweren die Interpretation der gewonnenen Daten. Im Gegensatz dazu führt die Belichtung einer Zelle nicht zu solchen Nebeneffekten. Ich habe daher eine transgene Mauslinie hergestellt, deren Männchen in ihren Spermien bPAC exprimieren. In den Spermien dieser Mäuse kann durch Belichtung die cAMP-Synthese aktiviert werden (Abbildung 2a). cAMP reguliert unter anderem die Geschwindigkeit des Flagellenschlags. Durch die Expression von bPAC lässt sich in transgenen Spermien der Flagellenschlag durch Belichtung kontrollieren: Ein einzelner Lichtblitz von 200 ms reicht aus, um die Schlagfrequenz des Flagellums zu steigern (Abbildung 2b).

Wie wichtig cAMP für die Spermienfunktion ist, zeigt das *knockout*-Mausmodell *sNHE-KO*, dem die aktive SACY fehlt. In den Spermien der *sNHE-KO*-Männchen findet keine cAMP-Synthese mehr statt. Die Spermien zeigen keine Vorwärtsbewegung; die *sNHE KO*-Männchen sind unfruchtbar. Um die Motilität der Spermien durch Licht wieder in Gang zu bringen, habe ich bPAC-Mäuse mit *sNHE KO*-Mäusen gekreuzt. Im

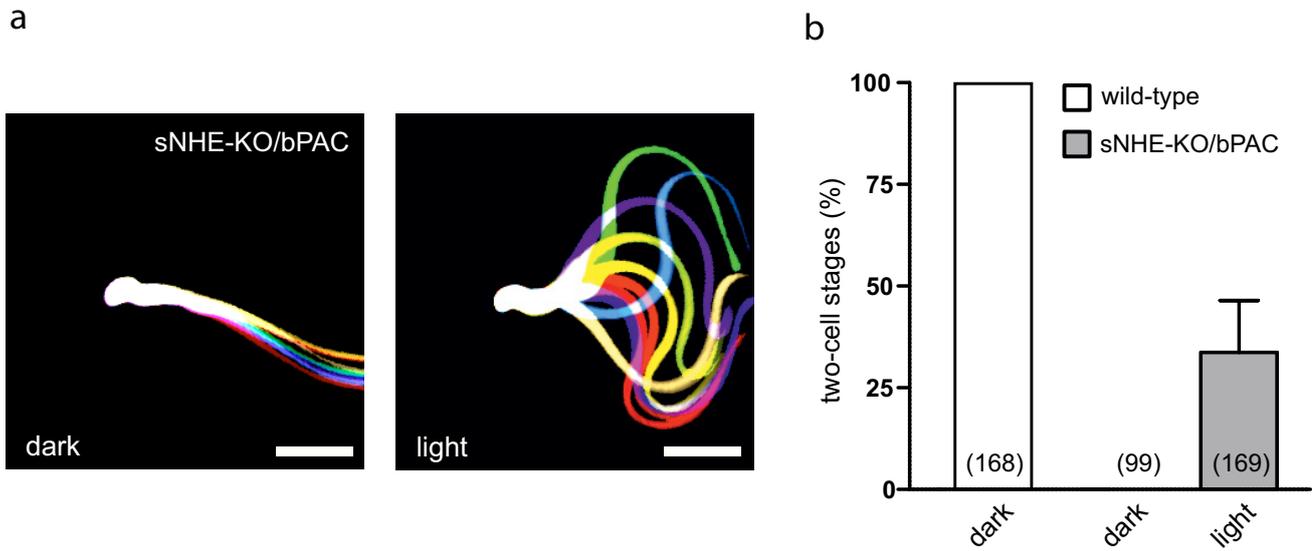
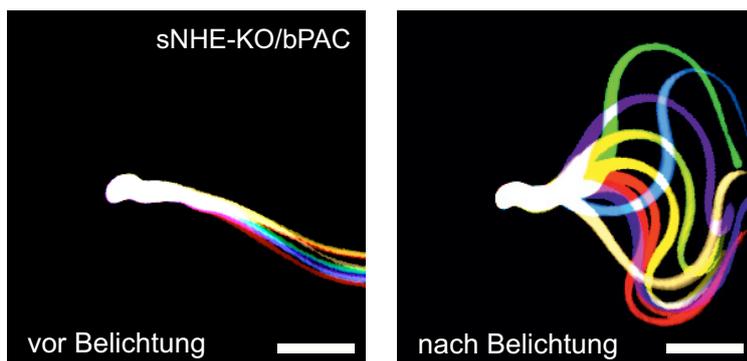


Figure 3: **a.** *sNHE-KO/bPAC* sperm are immotile in the dark. A flash of light restores the flagellar beating. **b.** When stimulated by light, *sNHE-KO/bPAC* sperm are able to fertilize the egg *in vitro*.

found, but if the experiment is carried out in the light, *sNHE-KO/bPAC* sperm can successfully fertilize egg cells (figure 3b).

The results of my Ph.D. thesis show that fundamental processes like fertilization can be controlled by light. Thus, optogenetics has conquered a new field of research in addition to neuroscience.

a



b

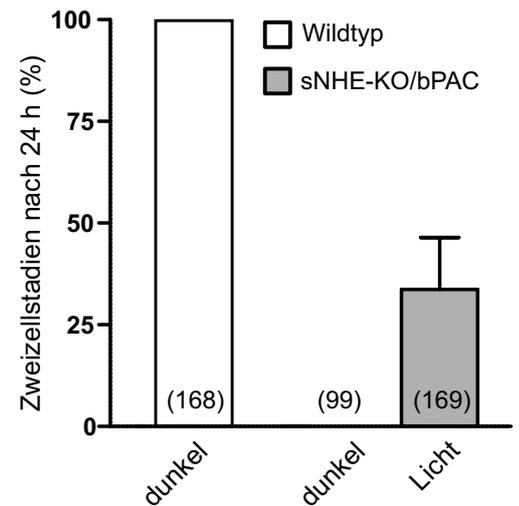


Abbildung 3: a. *sNHE-KO/bPAC*-Spermien sind im Dunkeln unbeweglich. Ein kurzer Lichtblitz stellt den Flagellenschlag wieder her. b. Die Stimulation mit Licht ermöglicht die Befruchtung von Eizellen durch *sNHE-KO/bPAC*-Spermien *in vitro*.

Dunkeln sind die Spermien dieser doppelt-transgenen Mäuse ebenfalls unbeweglich. Werden die Spermien allerdings belichtet, beginnt das Flagellum wieder zu schlagen und die Spermien schwimmen wieder (Abbildung 3a). Auch die Ei-Befruchtung konnte ich durch Licht *in vitro* wiederherstellen. Bei diesem Experiment werden Spermien und Eizellen gemeinsam inkubiert und die Anzahl der befruchteten Eizellen (Zweizellstadien) bestimmt. Im Dunkeln findet man mit doppelt-transgenen Spermien keine Zweizellstadien, wird das Experiment allerdings bei Licht durchgeführt, werden Eizellen erfolgreich befruchtet (Abbildung 3b).

Die Ergebnisse meiner Doktorarbeit zeigen, dass so grundlegende Prozesse wie die Befruchtung einer Eizelle durch Licht gesteuert werden können. Damit hat die Optogenetik neben den Neurowissenschaften ein weiteres Forschungsfeld erobert.

Vera Jansen studied biology at the RWTH Aachen. In July 2010, she was awarded her Diplom for her work with Professor Uwe Conrath on protein kinase in the pathogen resistance of *Arabidopsis thaliana*. For her Ph.D. thesis, she joined Professor Kaupp's Department of Molecular Sensory Systems at Research Center caesar. Her work focused on optogenetic methods to control the intracellular messenger cAMP. She received her doctorate in December 2014. Since January 2015, she is working as a post-doc with Dr. Dagmar Wachten in the Molecular Physiology Research Group.





Vera Jansen hat Biologie an der RWTH Aachen studiert. Im Juli 2010 erhielt sie ihr Diplom für ihre Arbeit bei Prof. Uwe Conrath über Proteinkinasen in der Pathogenresistenz von *Arabidopsis thaliana*. Für ihre Doktorarbeit wechselte sie in die Abteilung Molekulare Neurosensorik von Prof. Kaupp ans Forschungszentrum caesar. Hier beschäftigte sie sich mit optogenetischen Methoden zur Kontrolle des intrazellulären Botenstoffs cAMP. Im Dezember 2014 hat sie ihren Dokortitel erhalten und arbeitet seit Januar 2015 als Postdoc in Dr. Dagmar Wachtens Arbeitsgruppe Molekulare Physiologie.

Capturing proteins live in action

Shatanik Mukherjee

Protein molecules are the executives in biology. They carry out a myriad of both intracellular and extracellular functions. Functions of proteins rely on protein motions. Protein structures, obtained with X-ray diffraction or nuclear magnetic resonance (NMR), reveal mostly static pictures and do not directly reveal structure/function relations. To connect structural changes of proteins with function, protein motions have to be captured in real time.

Proteins undergo motions occurring in different time ranges (femtosecond - millisecond). The functionally relevant motions occur in the millisecond – microsecond time range. The question is how we record these protein motions to capture the protein in action. We have studied the cyclic nucleotide-binding domain of the bacterial potassium channel MloK1 (mICNBD) as a model system to study the motion of different parts of the protein (Figure 1).

Contact

Shatanik Mukherjee
 Research Center caesar
 Department of
 Molecular Sensory Systems
 Phone: +49 (0)228 9656-199
 shatanik.mukherjee@caesar.de

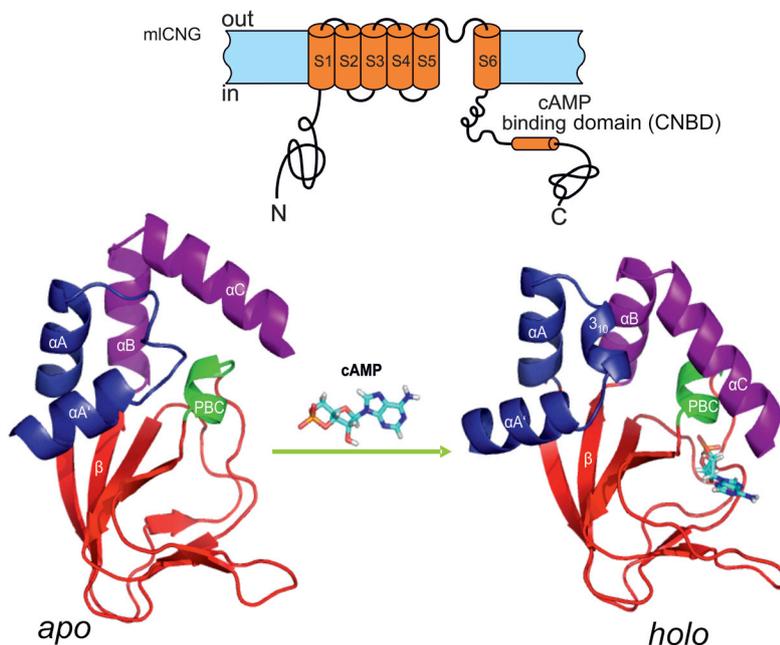


Figure 1: Conformational changes in mICNBD upon cAMP-binding. MloK1 is a tetrameric channel, each subunit contains a cytosolic cAMP binding region (mICNBD). *apo* mICNBD (isolated cAMP binding region) undergoes structural rearrangements upon cAMP-binding to reach *holo* mICNBD state.

Wie fängt man Proteine ein?

Shatanik Mukherjee

Kontakt

Shatanik Mukherjee
Forschungszentrum caesar
Abteilung
Molekulare Neurosensorik
Telefon: +49 (0)228 9656-199
shatanik.mukherjee@caesar.de

Proteine steuern viele intra- und extrazelluläre Funktionen. Entscheidend dafür ist, dass sie sich frei bewegen und ihre Konformation ändern. Mit klassischen Methoden wie Röntgenbeugung und Kernspinresonanz (NMR) erhält man nur statische Bilder, mit denen man keine Wechselwirkungen zwischen Struktur und Funktion aufklären kann. Um dies zu erreichen, müssen Proteine eingefangen und ihre Konformationsänderungen in Echtzeit verfolgt werden.

Proteine bewegen sich auf unterschiedlichen Zeitskalen – von Femtosekunden bis hin zu Millisekunden. Relevant ist vor allem der Bereich zwischen Mikro- und Millisekunden. Wie kann man in diesem Bereich Proteine einfangen und ihre Konformationsänderungen verfolgen? Ich habe diese Fragestellung in meiner Doktorarbeit an der Bindedomäne (mICNBD) für zyklische Nukleotide des bakteriellen Kaliumkanals MloK1 erforscht (Abbildung 1).

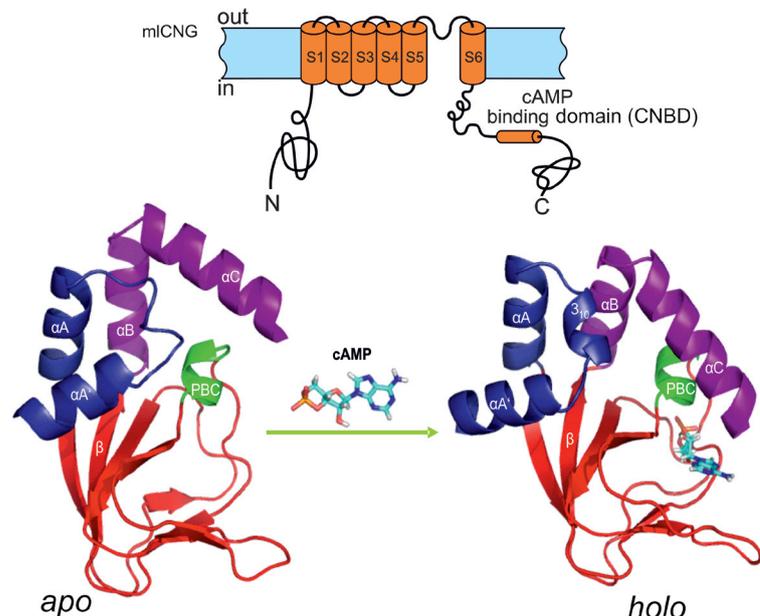


Abbildung 1: Konformationsänderungen von mICNBD nach der cAMP-Bindung. MloK1 ist ein tetramerer Ionenkanal. Jede Untereinheit enthält eine intrazelluläre cAMP-Bindedomäne (mICNBD). Die isolierte cAMP-Bindedomäne (*apo*-mICNBD) ändert ihre Konformation, nachdem cAMP an sie gebunden ist und erreicht so den *holo*-Zustand.

Cyclic adenosine monophosphate (cAMP) binds to mICNBD as a ligand, resulting in a structural change from the cAMP-free (*apo*) to the cAMP-bound (*holo*) state which leads to the activation of the channel. Recent kinetic and NMR studies indicate that these structural transitions follow the “induced-fit” mechanism i.e. the protein undergoes motions to rearrange the structure after binding to cAMP. However, the detailed mechanism of these structural rearrangements leading to channel activation remains elusive.

To record the underlying motion in different parts of the protein leading to structural changes in real-time, we have used two different approaches. First, we have studied a change in conformation upon ligand binding using a FRET (Förster resonance energy transfer) construct with mICNBD. FRET is a mechanism describing energy transfer between two light-sensitive molecules, a donor and an acceptor. It can be used to determine whether two fluorophores are within a certain distance of each other. We have created a mICNBD-FRET sensor by attaching the fluorophores citrine and cerulean to N- and C-terminal ends of mICNBD, respectively (Figure 2). Cerulean acts as a fluorescence energy donor to citrine. The amount of energy transfer depends on the distance and orientation between the two fluorophores. Upon binding to cAMP, the structural rearrangement in mICNBD leads to less energy transfer from cerulean to citrine. The change in fluorescence was recorded over time to determine the time constant for global structural rearrangement.

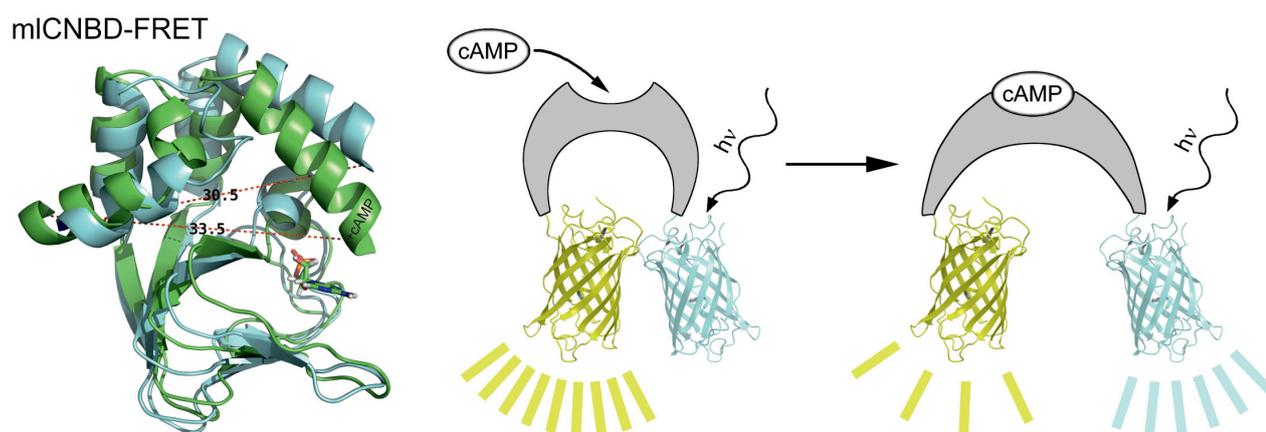


Figure 2: Design of mICNBD-FRET construct. Design of mICNBD-FRET sensor based on conformational changes in the protein. *apo* and *holo* states of mICNBD are indicated in blue and green respectively. The distance between N and C-terminal ends of the protein increases from *apo* (30.5 angstrom) to *holo* (33.5 angstrom) state. Representative illustration of the mICNBD-FRET sensor showing the changes in fluorescence upon structural changes.

Zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) bindet als Ligand an mICNBD. Diese Bindung führt zu einer Strukturänderung vom cAMP-freien (*apo*) zum cAMP-gebundenen (*holo*) Zustand der Bindedomäne. Im *holo*-Zustand ist der Kanal MloK1 aktiviert. Kinetische Untersuchungen und NMR-Studien legen nahe, dass die strukturellen Änderungen dem sogenannten *Induced-Fit*-Mechanismus folgen. Das bedeutet, dass Ligand und Protein nicht statisch interagieren, sondern bei Annäherung ihre Konformationen so ändern, dass sich ein Protein-Ligand-Komplex bilden kann. Der genaue Mechanismus ist bislang jedoch unbekannt.

Um die verschiedenen Proteinbereiche während der strukturellen Änderungen zu verfolgen, haben wir zwei Ansätze gewählt: Zunächst haben wir die Konformationsänderungen nach der Ligandenbindung mittels FRET (*Förster resonance energy transfer*) untersucht. Mit FRET kann man den Energietransfer zwischen zwei lichtempfindlichen Molekülen messen, einem Donor- und einem Akzeptormolekül. Die Methode wird verwendet, um den Abstand zweier Fluorophore – also Farbstoffe, die nach Lichtanregung spontan fluoreszieren – zu messen. Ich habe einen mICNBD-FRET-Sensor mit den beiden Fluorophoren *Citrine* (am N-Ende) und *Cerulean* (am C-Ende) hergestellt. *Cerulean* agiert als Donor, *Citrine* als Akzeptor. Die Energiemenge, die übertragen wird, hängt vom Abstand und der Orientierung der beiden Fluorophore ab. Nach der Bindung durch cAMP verringert sich aufgrund der Konformationsänderungen die Energie, die von *Cerulean* auf *Citrine* übertragen wird.

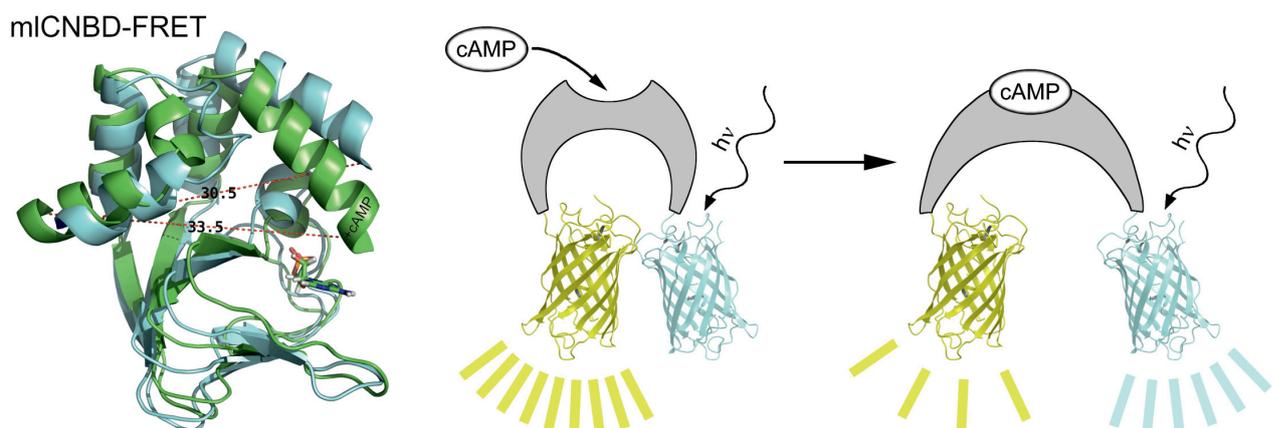


Abbildung 2: Design eines mICNBD-FRET-Sensors. Links: Eingezeichnet sind der *apo*-Zustand (blau) und der *holo*-Zustand (grün) von mICNBD. Der Abstand zwischen dem N- und dem C-terminalen Ende des Proteins steigt vom *apo*-Zustand (30.5 Ångstrom) zum *holo*-Zustand (33.5 Ångstrom) an. Rechts: Schematische Darstellung des mICNBD-FRET-Sensors. Man sieht die Veränderungen der Fluoreszenz aufgrund der Konformationsänderung.

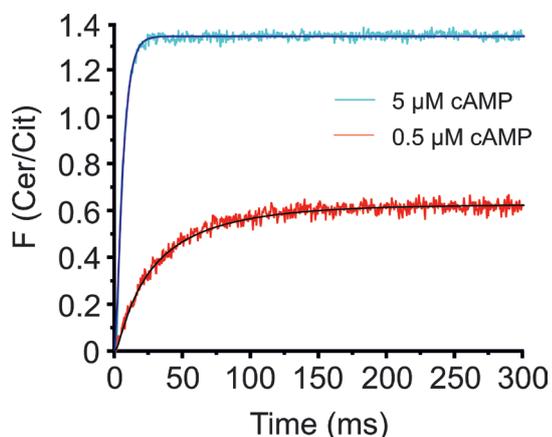


Figure 3: Time course of FRET changes. Kinetic response of mICNBD-FRET (1.6 μM) in response to binding of cAMP (0.5, and 5 μM).

A simple mathematical model to describe “induced-fit” ligand binding (Figure 3) represented the data reasonably well. It was found out that the global structural change in mICNBD takes place with a time constant of 2.5 ms.

Second, to resolve the motion of different parts of mICNBD upon cAMP-binding, we used transient Electron Paramagnetic Resonance (tr-EPR) spectroscopy in conjunction with Site-Directed Spin Labeling (SDSL). EPR is a technique similar to NMR, but it is electron spins that are excited instead of the spins of atomic nuclei. SDSL is a technique for investigating the structure and local dynamics of proteins. We introduced cysteine residues at different sites in the protein to allow labeling with Methane Thio Sulphonate Spin Label (MTSSL). Binding of cAMP to the labeled mutants is rapidly initiated either via photolysis of a caged-cAMP or through a micro-mixer. The time-resolved EPR data revealed that the structural changes that take place at a particular site progress on a millisecond time scale. Collecting data across the whole protein will enable us to reconstruct the steps from the *apo* to the *holo* state of the protein. It will also provide the answer to the question whether the “induced-fit” mechanism follows a concerted (single step) or sequential (multi-step) path from the *apo* to the *holo* conformation.

Shatanik Mukherjee completed his Master degree in Biochemical Engineering and Biotechnology in 2009 from the Indian Institute of Technology, Kharagpur. He completed his doctoral studies on the “Dynamics of a cyclic nucleotide-binding domain” in September, 2014. Right now he is engaged as postdoctoral researcher in the Department of Molecular Sensory Systems, Research Center caesar.



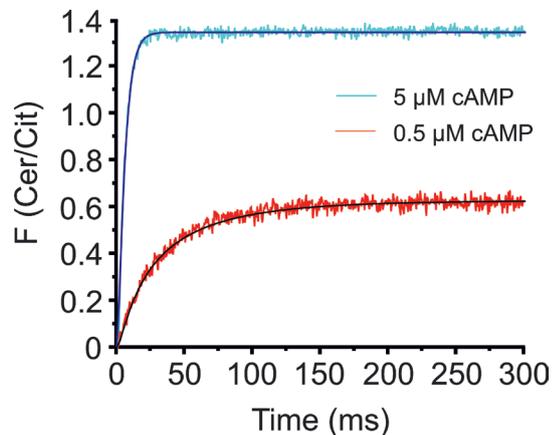


Abbildung 3: Zeitlicher Verlauf der FRET-Änderungen. Kinetische Antwort von mLCNBD-FRET (1,6 μM) nach der Bindung von cAMP (0,5 und 5 μM).

Mit einem einfachen mathematischen Modell konnte ich den *Induced-Fit*-Mechanismus gut beschreiben und die Zeitkonstante der globalen Konformationsänderung von mLCNBD bestimmen; sie beträgt 2,5 ms.

Um die strukturellen Änderungen der Bindedomäne mLCNBD nach der cAMP-Bindung auch lokal präzise zu messen, haben wir eine zweite Technik eingesetzt, die transiente elektronen-paramagnetische Resonanzspektroskopie (tr-EPR), in Verbindung mit Spin-Markierung (*Site-Directed Spin Labeling*; SDSL). EPR ist eng verwandt mit NMR, mit dem Unterschied, dass Elektronenspins anstelle von Kernspins verwendet werden. An verschiedenen Stellen des Proteins habe ich Cysteinreste eingefügt, um diese mit einem Methanethiosulfonat-Spinlabel (MTSSL) zu versehen. Die cAMP-Bindung an diese markierten Proteine wird durch Photolyse von *caged*-cAMP oder durch einen Mikromixer eingeleitet. Ich fand heraus, dass die Konformationsänderung an einer bestimmten Stelle des Proteins im Millisekundenbereich abläuft. Wenn wir entlang der gesamten Proteinkette Daten erheben, können wir zukünftig alle Schritte vom *apo*- zum *holo*-Zustand des Proteins rekonstruieren. Dies wird die Frage beantworten, ob der *Induced-Fit*-Mechanismus über einen konzertierten (Einschritt-)Weg oder über einen sequentiellen (Mehrschritt-)Weg abläuft.



Shatanik Mukherjee erhielt seinen Master in biologischer Verfahrenstechnik und Biotechnologie im Jahr 2009 am Indian Institute of Technology in Kharagpur. Seine Doktorarbeit über "Dynamics of a cyclic nucleotide-binding domain" schloss er im September 2014 ab. Seitdem arbeitet er als Postdoktorand am Forschungszentrum caesar in der Abteilung Molekulare Neurosensorik.

Ligand binding of pacemaker ion channels

Holger Fehlauer

The heartbeat is generated in the sinoatrial node – the heart’s pacemaker. This involves the electric charging and discharging of the sinoatrial node cells again. Part of the discharging process is mediated by so-called pacemaker ion channels. These channels also play a key role in accelerating the heartbeat: Upon binding of cyclic adenosine monophosphate pacemaker channels open faster. In my Ph.D. thesis, I investigated this binding in greater detail.

Ion channels are pores that traverse the cell membrane. They allow cells to exchange ions – charged particles – with the environment surrounding the cell. As a result, cells can react to intra- and extracellular stimuli and change their membrane potential. In my doctorate, I worked on the so-called pacemaker ion channels, also known by the technical term HCN channels (hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated). HCN channels form tetramers; they are made up of four subunits that arrange themselves around a central pore (Figure 1). Each subunit consists of a channel domain and of an intracellular binding domain (cyclic nucleotide-binding domain, CNBD). HCN channels have unusual properties: They are activated when the membrane potential becomes more negative, i.e. when the cell is hyperpolarized. This channel activation is also influenced by ligand binding. Upon binding of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) to the HCN-CNBD, the channels open faster. The interplay between hyperpolarization-induced activation and cAMP binding is very complex.

Contact

Holger Fehlauer
 Research Center caesar
 Department of
 Molecular Sensory Systems
holger.fehlauer@caesar.de

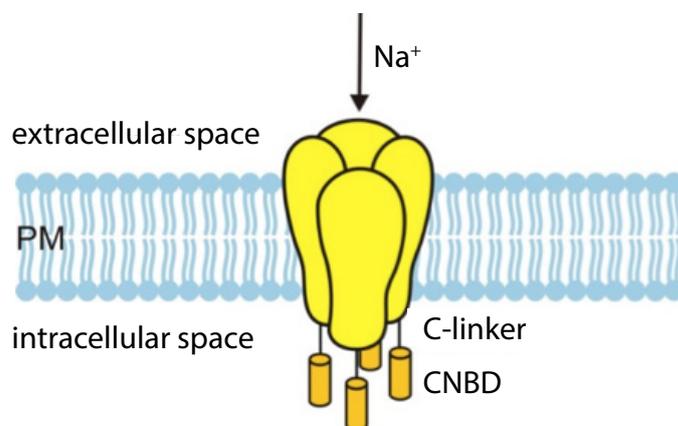


Figure 1: Structure of an HCN channel. HCN channels are made up of four subunits, which join together to form one channel. Each subunit consists of a channel domain and an intracellular CNBD.

Ligandenbindung von Schrittmacher-Ionenkanälen

Holger Fehlauer

Kontakt

Holger Fehlauer

Forschungszentrum caesar

Abteilung

Molekulare Neurosensorik

holger.fehlauer@caesar.de

Der Herzschlag wird im Sinusknoten – dem Taktgeber des Herzens – erzeugt. Die Sinusknotenzellen werden dabei elektrisch aufgeladen und wieder entladen. Ein Teil der Entladung geschieht durch sogenannte Schrittmacher-Ionenkanäle. Diese Kanäle spielen auch eine entscheidende Rolle bei der Beschleunigung des Herzschlags: Bindet zyklisches Adenosinmonophosphat an die Schrittmacher-Kanäle, so öffnen die Kanäle schneller. In meiner Doktorarbeit habe ich diese Bindung genauer untersucht.

Ionenkanäle sind Poren, die die Zellmembran durchspannen. Sie ermöglichen den Zellen, Ionen – geladene Teilchen – mit dem Milieu außerhalb der Zelle auszutauschen. Damit können Zellen auf intra- und extrazelluläre Reize reagieren und das Membranpotenzial verändern. In meiner Doktorarbeit haben ich mich mit den sogenannten Schrittmacherkanälen beschäftigt, die im Fachterminus HCN-Kanäle (*hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated channels*) heißen. HCN-Kanäle bilden Tetramere; sie bestehen aus vier Untereinheiten, die sich um eine zentrale Pore anordnen (Abbildung 1). Jede Untereinheit besteht aus einer Kanaldomäne und einer intrazellulär gelegenen Bindedomäne (*cyclic nucleotide-binding domain*, CNBD). HCN-Kanäle haben ungewöhnliche Eigenschaften: Sie werden aktiviert, wenn das Membranpotenzial negativer wird, die Zelle also hyperpolarisiert. Die Kanalaktivierung wird außerdem durch Ligandenbindung beeinflusst. Bindet zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) an die HCN-CNBD, so werden die Kanäle schneller

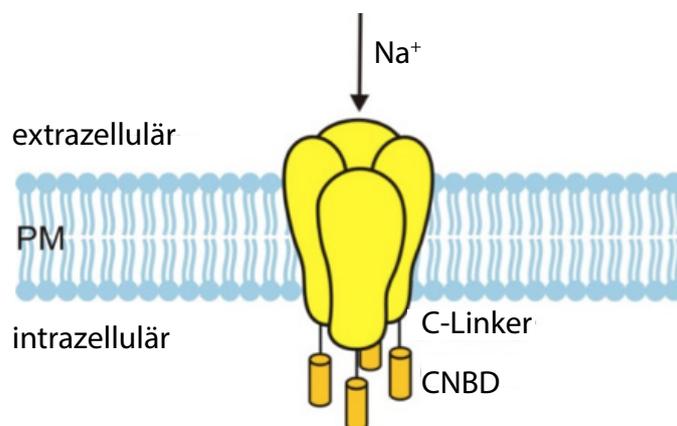


Abbildung 1: Aufbau eines HCN-Kanals. HCN-Kanäle bestehen aus vier Untereinheiten, die sich zu einem Kanal zusammenlagern. Jede Untereinheit besteht aus einer Kanaldomäne und einer intrazellulär gelegenen CNBD.

Fundamental properties of the cAMP binding of HCN channels have already been investigated on the isolated CNBD. Here, binding is independent of the interaction between the CNBD and the channel domain. Some of these studies were presented in the 2010 Annual Report (“From monomer to tetramer – strength in numbers”). Isolated CNBDs were used to determine not only the interactions between cAMP and CNBD, but also the cAMP-induced conformational changes of the CNBD. One purpose of these conformational changes is to stabilize the binding, another is to facilitate tetramerization of the CNBDs. Using fluorescence optical methods, it was demonstrated that the binding of tetramerized CNBDs differs from the binding of monomeric CNBDs. Thus, the binding time to tetramers is considerably longer.

But, what are the properties of the cAMP binding of intact HCN channels, where there is also an interaction between the CNBDs and the channel domains? To study this binding, I first had to refine a fluorescence optical method. The aim was to investigate cAMP binding under conditions that were as native as possible. What does that mean? For the interaction between the channel domain and the CNBD, their relative positions seem to play an important role. This position is determined by, among other things, the plasma membrane. For this reason, I used HCN channels that were embedded in the plasma membrane.

To observe the ligand binding with fluorescence optical methods, I used cAMP that was coupled to the fluorescent molecule Atto488. In order to bind, Atto488cAMP needs to reach the HCN-CNBDs. At HCN channels, the CNBDs are located inside the cells. However, the plasma membrane represents an impenetrable obstacle to Atto488cAMP. I therefore created so-called “inside-out” plasma membrane sheets, in which the intracellular region of the membrane is exposed, and thus accessible for extracellular substances. Consequently, I was able to incubate the HCN channels and, in particular, their CNBDs, with Atto488cAMP.

I observed the accumulation of Atto488cAMP at the HCN-CNBDs using fluorescence microscopy. However, conventional microscopy techniques would show both: bound and free Atto488cAMP. To reduce the background signal that originates from free Atto488cAMP, I used a special microscopy technique known as total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy. In TIRF microscopy – unlike for conventional EPI fluorescence microscopy – only a small region of above the microscopy cover slide (of about 300 nm) is illuminated. The plasma membrane sheets with the HCN channels are located specifically in this region. The result is almost exclusive excitation of Atto488cAMP that is bound to the channels. Free Atto488cAMP, which is further away from the slide, is not excited. In this way, the fluorescence intensity can be attributed directly to bound Atto488cAMP.

aktiviert. Dabei kommt es zu einem komplexen Wechselspiel zwischen der Aktivierung durch Hyperpolarisierung und der cAMP-Bindung.

Grundlegende Eigenschaften der cAMP-Bindung von HCN-Kanälen konnten bereits an der isolierten CNBD untersucht werden. Hierbei ist die Bindung unabhängig vom Wechselspiel zwischen der CNBD und der Kanaldomäne. Einige dieser Untersuchungen wurden bereits im Jahresbericht von 2010 vorgestellt („Vom Monomer zum Tetramer – Gemeinsam sind wir stärker“). Anhand von isolierten CNBDs wurden sowohl die Wechselwirkungen zwischen cAMP und CNBD bestimmt als auch die cAMP-induzierten Konformationsänderungen der CNBD. Diese Konformationsänderungen dienen zum einen zur Stabilisierung der Bindung, zum anderen ermöglichen sie eine Tetramerisierung der CNBDs. Mithilfe von fluoreszenzoptischen Methoden konnte gezeigt werden, dass sich die Bindung an tetramerisierte CNBDs von der Bindung an monomere CNBDs unterscheidet. Die Bindungszeit an Tetramere ist demnach deutlich größer.

Aber welche Eigenschaften hat die cAMP-Bindung von intakten HCN-Kanälen, bei denen es zusätzlich zum Wechselspiel zwischen den CNBDs und den Kanaldomänen kommt? Um diese Bindung untersuchen zu können, musste ich zunächst eine fluoreszenzoptische Methode weiterentwickeln. Ziel war es, die cAMP-Bindung unter möglichst nativen Bedingungen nachweisen zu können. Was heißt das? Beim Wechselspiel zwischen Kanaldomäne und CNBD scheint die relative Position der beiden zueinander eine wichtige Rolle zu spielen. Diese Position wird unter anderem durch die Plasmamembran bestimmt. Darum habe ich HCN-Kanäle verwendet, die sich in der Plasmamembran befinden.

Um die Ligandenbindung mit fluoreszenzoptischen Methoden beobachten zu können, habe ich cAMP verwendet, an das das Fluoreszenzmolekül Atto488 gekoppelt war. Damit sich Atto488cAMP chemisch binden kann, muss es an die intrazellulär gelegenen CNBDs der HCN-Kanäle gelangen. Dabei stellt die Plasmamembran jedoch ein undurchdringliches Hindernis für das Atto488cAMP dar. Ich habe deshalb sogenannte *inside out*-Plasmamembransheets hergestellt, bei denen der intrazelluläre Bereich der Membran freigelegt und somit für extrazelluläre Stoffe frei zugänglich ist. Dadurch konnte ich die HCN-Kanäle und speziell deren CNBDs mit Atto488cAMP inkubieren.

Die Atto488cAMP-Anreicherung an die HCN-CNBDs habe ich mit Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen. Mit konventionellen Mikroskopietechniken würde jedoch sowohl gebundenes als auch freies Atto488cAMP nachgewiesen werden. Um das Hintergrundsignal zu reduzieren, das von freiem Atto488cAMP stammt, habe ich eine spezielle Mikroskopietechnik verwendet: die sogenannte interne Totalreflexions-Fluoreszenzmikroskopie (TIRF-Mikroskopie). Bei der TIRF-Mikroskopie wird

But, can this technique also be used to investigate cAMP binding? To demonstrate this, I used a binding domain whose cAMP binding is well characterized, the CNBD of a bacterial CNG channel (hereinafter “mICNBD”). Figure 2 shows fluorescence micrographs of membrane sheets with and without mICNBD. At membrane sheets with mICNBD, the fluorescence increased Atto488cAMP-dose-dependently. In contrast there was no fluorescence increase at membrane sheets without mICNBD. Therefore, I was able to demonstrate the specific binding of Atto488cAMP to mICNBD by the increase in fluorescence. I was able to confirm this by flooding mICNBD sheets with a high abundance of “normal” cAMP: the fluorescence intensity decreased. The reason for this is that cAMP competes with Atto488cAMP for the same mICNBDs, and eventually displaces the Atto488cAMP. Thus, it is possible to demonstrate Atto488cAMP binding with this technique. To investigate the influence of the HCN channel domain on cAMP binding, I compared the binding affinity of isolated CNBDs with that of intact HCN channels. It turned out that binding of intact channels is considerably weaker than binding of isolated CNBDs. This could be caused not only to the influence of the channel domain, but also to the mutual influence of the CNBDs onto each other.

Next, I determined the binding time of Atto488cAMP to HCN channels by recording series of fluorescence micrographs. For this I used low Atto488cAMP concentrations to avoid overlapping of the fluorescence of individual Atto488cAMP molecules. Skillfully selected photographic conditions ensured that free Atto888cAMP

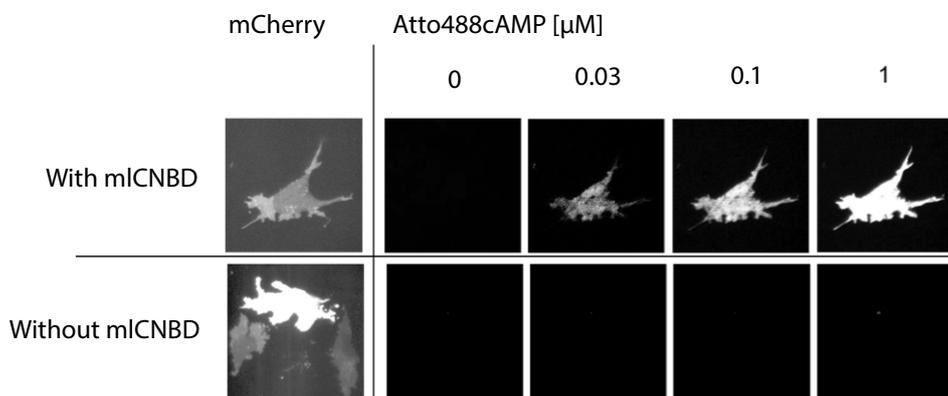


Figure 2: Atto488cAMP binding to mICNBD. Fluorescence micrographs of a membrane sheet with mICNBD (top) and without mICNBD (bottom) at different Atto488cAMP concentrations.

– anders als bei der konventionellen EPI-Fluoreszenzmikroskopie – nicht die gesamte Probe oberhalb des Objektträgers beleuchtet, sondern nur ein kleiner Bereich (bis zu ca. 300 nm). Genau in diesem Bereich befanden sich die Plasmamembransheets mit den HCN-Kanälen. Dadurch wird fast ausschließlich Atto488cAMP angeregt, das an die Kanäle gebunden ist. Freies Atto488cAMP, das weiter vom Objektträger entfernt ist, wird nicht angeregt. Auf diese Weise kann die Fluoreszenzintensität direkt dem gebundenen Atto488cAMP zugeordnet werden.

Doch kann man mit dieser Technik auch die cAMP-Bindung untersuchen? Um das zu zeigen, habe ich eine Bindedomäne verwendet, deren cAMP-Bindung gut bekannt ist, die CNBD eines bakteriellen CNG-Kanals (im Folgenden „mICNBD“ genannt). In Abbildung 2 sind Fluoreszenzaufnahmen von Membransheets mit und ohne mICNBD dargestellt. Bei Membransheets mit mICNBD stieg die Fluoreszenz Atto488cAMP-dosisabhängig an, bei Membransheets ohne mICNBD war das nicht der Fall. Durch den Fluoreszenzanstieg konnte ich also die spezifische Atto488cAMP-Bindung an die mICNBD nachweisen. Dies konnte ich bestätigen, indem ich die mICNBD-Sheets mit einem hohen Überschuss von „normalem“ cAMP überspült habe: Die Fluoreszenzintensität nahm dadurch ab. Der Grund hierfür ist, dass das cAMP mit dem Atto488cAMP um dieselben mICNBDs konkurriert und das Atto488cAMP letztlich verdrängt. Es ist also mit dieser Technik möglich, die Atto488cAMP-Bindung nachzuweisen. Um den Einfluss der HCN-Kanaldomäne auf die cAMP-Bindung zu untersuchen, habe ich die Bindungsaffinität von isolierten CNBDs mit der von intakten HCN-Kanälen verglichen. Es zeigte sich, dass die Bindung an intakte Kanäle

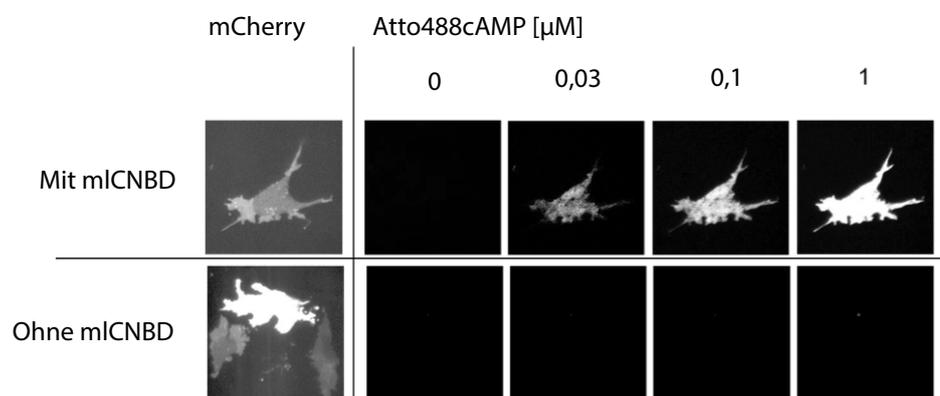


Abbildung 2: Atto488cAMP-Bindung an mICNBD. Fluoreszenzbilder von einem Membransheet mit mICNBD (oben) und ohne mICNBD (unten) bei unterschiedlichen Atto488cAMP-Konzentrationen.

molecules were not observed with this technique: free molecules move too fast to be detectable by the camera. Bound Atto488cAMP was slowed and thereby detectable.

To determine the binding times, I had to identify individual Atto488cAMP molecules and measure the time in which they could be detected. However, it is by no means easy to detect single-molecule fluorescence; the intensity of a single molecule is very low. Consequently, the signal differs little from the background signal which, unfortunately, is always present on fluorescence micrographs. However, single-molecule fluorescence can be detected if these background signals are filtered out. I did this in six image processing steps.

Figure 3 shows the region of a supposed molecule before and after these six processing steps. After image processing, the only signals that remained were presumed to originate from Atto488cAMP molecules. With the aid of simulations, I showed that the program is actually able to detect molecules. Using an analytical program, I was then able to determine the binding times of Atto488cAMP.

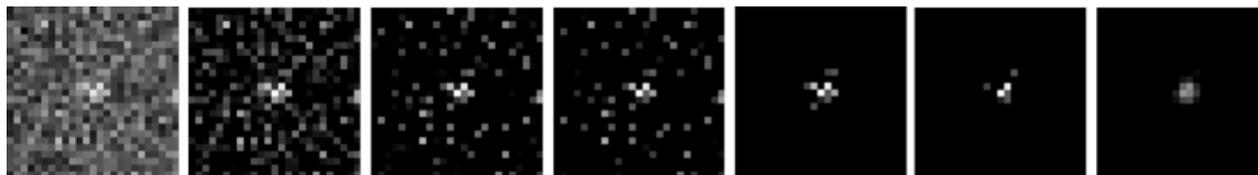


Figure 3: Image processing steps. Fluorescence micrograph of a supposed Atto488cAMP molecule (central area of the image), before (left) and after the six processing steps.

deutlich schwächer ist als die Bindung an isolierte CNBDs. Das könnte sowohl auf den Einfluss der Kanaldomäne als auch auf die Beeinflussung der CNBDs untereinander zurückzuführen sein.

Anschließend habe ich die Bindungszeit von Atto488cAMP an HCN-Kanälen bestimmt. Dazu habe ich Fluoreszenzbilderreihen aufgenommen. Die Atto488cAMP-Konzentration wird dabei so gering gewählt, dass sich die Fluoreszenz einzelner Atto488cAMP-Moleküle nicht überlagert. Durch geschickt gewählte Aufnahmebedingungen wurden freie Atto488cAMP-Moleküle bei dieser Technik nicht beobachtet: Freie Moleküle bewegen sich zu schnell, um von der Kamera nachgewiesen werden zu können. Gebundenes Atto488cAMP wurde durch die Bindung verlangsamt und dadurch nachweisbar.

Um die Bindungszeiten zu bestimmen, musste ich die einzelnen Atto488cAMP-Moleküle identifizieren und die Zeit messen, in der sie nachgewiesen werden konnten. Es ist aber gar nicht so einfach, Einzelmolekül-Fluoreszenz nachzuweisen; die Intensität einzelner Moleküle ist sehr gering. Das Signal unterscheidet sich daher nur wenig von den Hintergrundsignalen, die auf Fluoreszenzbildern leider immer vorhanden sind. Einzelmolekülfluoreszenz kann man jedoch eindeutig nachweisen, wenn man die Hintergrundsignale herausfiltert. Dies habe ich in sechs Bearbeitungsschritten gemacht.

Abbildung 3 zeigt den Bereich eines vermeintlichen Moleküls vor und nach den sechs Bearbeitungsschritten. Nach dem sechsten Bearbeitungsschritt blieben nur noch Signale über, die vermutlich von einzelnen Atto488cAMP-Molekülen stammen. Mithilfe von Simulationen zeigte ich, dass das Programm tatsächlich Moleküle nachweisen kann. Mit einem Auswertungsprogramm konnte ich anschließend die Bindungszeiten von Atto488cAMP bestimmen.

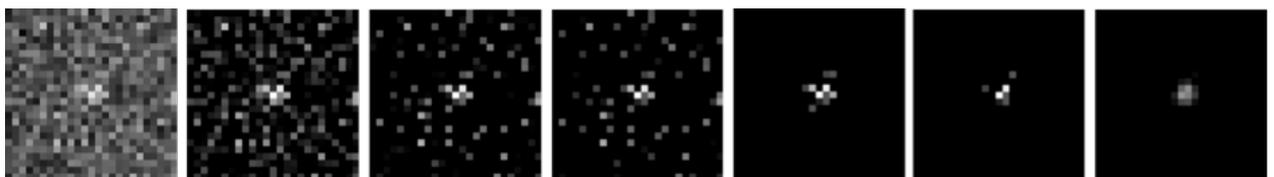


Abbildung 3: Bildbearbeitungsschritte. Fluoreszenzaufnahme eines vermeintlichen Atto488cAMP-Moleküls (zentraler Bereich der Aufnahme) vor (links) und nach den sechs Bearbeitungsschritten.

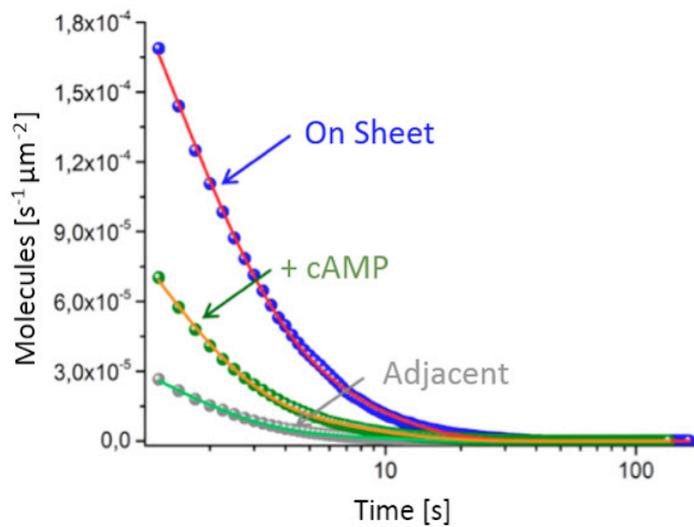


Figure 4: Cumulative histogram of the binding times of Atto488cAMP on a mHCN2 membrane sheet without (blue) and with cAMP (green) and adjacent to the sheet (gray). A biexponential curve was fitted to the histograms in each case.

Figure 4 shows the cumulative histograms, from which I calculated the binding times of HCN channels. In the histograms, the number of molecules is plotted against their residence time.

It is known that channel activation also influences cAMP binding. In order to be able to investigate the influence of the channel domain on cAMP binding even at different levels of channel activation, I added a patch clamp amplifier to the experimental set-up. With this set-up, the membrane potential could be altered, allowing the HCN channels to be activated. In the first trial, I was able to show that Atto488cAMP binding increased upon hyperpolarization. In further trials, it will now be possible to investigate whether longer binding times are the cause for the increase in binding.

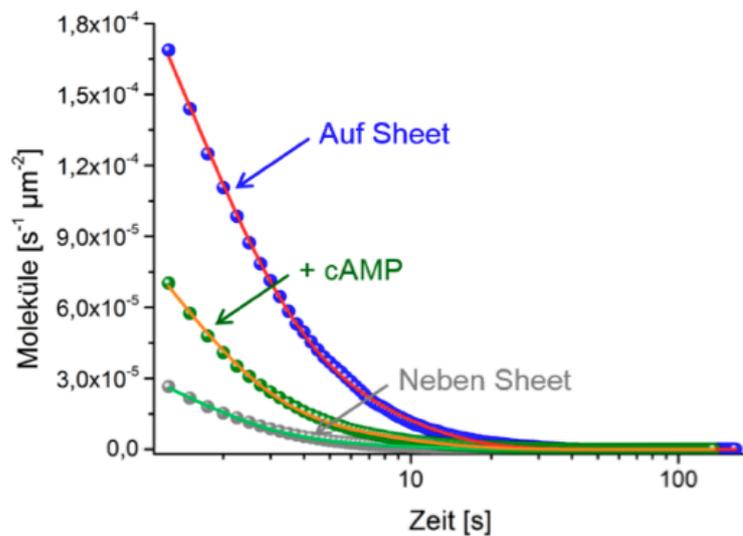
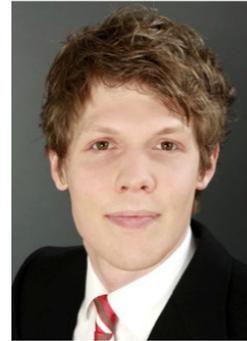


Abbildung 4: Kumulatives Histogramm der Bindungszeiten von Atto488cAMP auf einem mHCN2-Membransheet ohne (blau) und mit (grün) cAMP und neben dem Sheet (grau). An die Histogramme wurde jeweils ein biexponentieller Verlauf angepasst.

In Abbildung 4 sind die kumulativen Histogramme dargestellt, aus denen ich die Bindungszeiten von HCN-Kanälen berechnet habe. In den Histogrammen ist die Molekülzahl gegen die Aufenthaltszeit aufgetragen.

Es ist bekannt, dass auch die Kanalaktivierung die cAMP-Bindung beeinflusst. Um den Einfluss der Kanal-domäne auf die cAMP-Bindung auch bei unterschiedlicher Kanalaktivierung untersuchen zu können, habe ich das Messsystem um einen Patch-Clamp-Verstärker erweitert. Mit diesem Aufbau ließ sich das Membranpotenzial ändern, um dadurch die HCN-Kanäle zu aktivieren. In ersten Versuchen konnte ich zeigen, dass die Atto488cAMP-Bindung bei Hyperpolarisation zunahm. In weiteren Versuchen mit diesem Versuchsaufbau kann nun untersucht werden, ob längere Bindungszeiten die Ursache für die Bindungszunahme sind.

Holger Fehlauer studied general physics at Leibniz Universität Hannover. In November 2009, he received his Master's degree for his work on the investigation of plasmon-based laser transfection with Professor A. Heisterkamp. For his doctorate, he moved to Bonn, to the Department of Molecular Sensory Systems headed by Professor U. B. Kaupp at Research Center caesar. Here, he investigated the ligand binding of HCN channels by fluorescence optical methods. In January 2015, he was awarded his doctoral degree by the University of Cologne.





Holger Fehlauer hat Allgemeine Physik an der Leibniz Universität Hannover studiert. Im November 2009 erhielt er sein Diplom für seine Arbeit zur Untersuchung der Plasmonen-basierten Lasertransfektion bei Prof. A. Heisterkamp. Für seine Doktorarbeit wechselte er nach Bonn in die Abteilung Molekulare Neurosensorik von Prof. U. B. Kaupp ans Forschungszentrum caesar. Hier erforschte er die Ligandenbindung von HCN-Kanälen mit Hilfe von fluoreszenzoptischen Methoden. Im Januar 2015 erhielt er seinen Dokortitel von der Universität zu Köln.

How does lipid accumulation influence male fertility?

Diana Nancy Raju

Glycosphingolipids are key elements of biological membranes and control a variety of cellular functions. The simplest glycosphingolipid is **glucosylceramide (GlcCer)**. The accumulation of GlcCer results in life-threatening lipid storage-diseases or in male infertility. It is still unclear how GlcCer regulates cellular processes. Our work reveals that GlcCer accumulation in GBA2 knockout-mice alters cytoskeletal dynamics due to a more tightly packed lipid organization in the plasma membrane. In particular, the cytoskeletal organization in cellular structures that shape the sperm head is affected resulting in **globozoospermia** – a severe male fertility defect.

GlcCer is the simplest glycosphingolipid. It is degraded by beta-glucosidases – GBA1 and GBA2 (figure 1a). GBA1 and GBA2 are spatially separated in the cell. GBA1 is present in the lysosome. The lack of GBA1 is known to cause *Gaucher* disease in humans evoked by accumulation of GlcCer in the lysosomes. *Gaucher* disease is one of the most common lipid storage disorders affecting 1 in 20,000 people worldwide. Patients suffer from liver and spleen enlargement and, in the most severe cases, from impairment of the central nervous system. However, GBA2 and its function are ill-defined. We have shown that GBA2 is associated with the membranes of Golgi and endoplasmic reticulum (ER) [1].

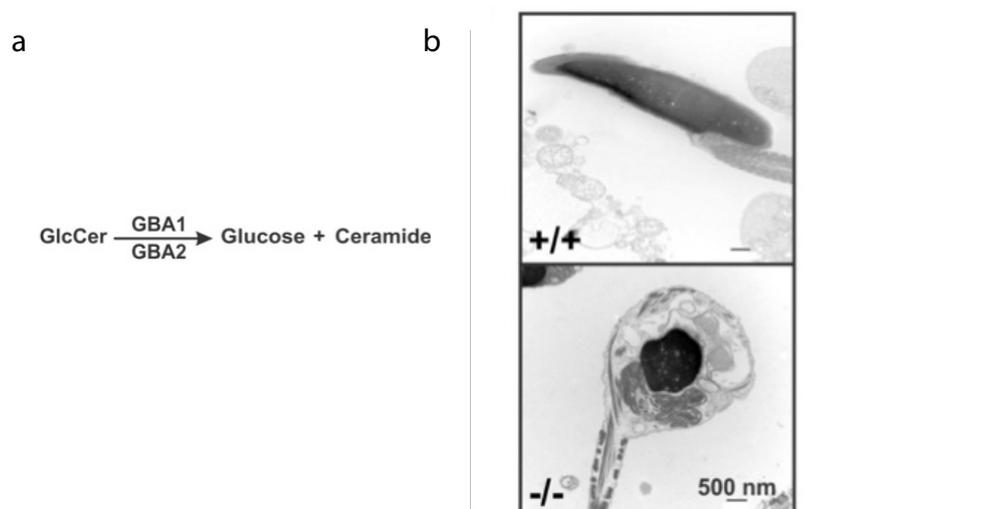


Figure 1: GBA2 metabolism and globozoospermia. a. Conversion of GlcCer to glucose and ceramide by GBA2. b. Electron micrographs showing defect in sperm morphology [2]. Top: wild type (+/+); bottom: GBA2 knockout (-/-). Scale bars: 500 nm.

Contact

Diana Nancy Raju
 Research Center caesar
 Max Planck Research Group
 Molecular Physiology
 Phone: +49 (0)228 9656-295
diana.raju@caesar.de

Wie beeinflusst die Anreicherung von Lipiden die männliche Fruchtbarkeit?

Diana Nancy Raju

Kontakt

Diana Nancy Raju
 Forschungszentrum caesar
 Max-Planck-Forschungsgruppe
 Molekulare Physiologie
 Telefon: +49 (0)228 9656-295
 diana.raju@caesar.de

Glykosphingolipide sind wichtige Bestandteile biologischer Membranen und steuern eine Vielzahl von Zellfunktionen. Das einfachste Glykosphingolipid ist Glukosylceramid (GlcCer). Die Anreicherung von GlcCer kann zu einer lebensbedrohlichen Fettstoffwechselkrankheit oder männlicher Unfruchtbarkeit führen. Es ist nach wie vor unklar, wie GlcCer die zellulären Prozesse reguliert. Unsere Arbeit zeigt, dass eine GlcCer-Anreicherung in *GBA2-Knockout*-Mäusen die Dynamik des Zytoskeletts in der Plasmamembran verändert, und zwar insbesondere in Zellstrukturen, die den Spermienkopf bilden. Dies hat die sogenannte Globozoospermie zur Folge, eine schwere Fruchtbarkeitsstörung beim Mann.

Das einfachste Glykosphingolipid ist GlcCer. Es wird durch beta-Glukosidasen – GBA1 und GBA2 – abgebaut (Abbildung 1a), die in der Zelle räumlich getrennt vorliegen. GBA1 verrichtet ihre Arbeit normalerweise in Lysosomen, den "Verdauungsorganellen" von Zellen. Fehlt GBA1, so reichert sich GlcCer in Lysosomen an. Es entsteht *Morbus Gaucher*, eine der häufigsten Fettstoffwechselkrankheiten. Weltweit leidet einer von 20.000 Menschen an *Morbus Gaucher*. Zu den Symptomen gehören eine Vergrößerung der Leber und Milz sowie in ganz schweren Fällen eine Schädigung des zentralen Nervensystem. GBA2 und seine Funktion sind dagegen kaum bekannt.

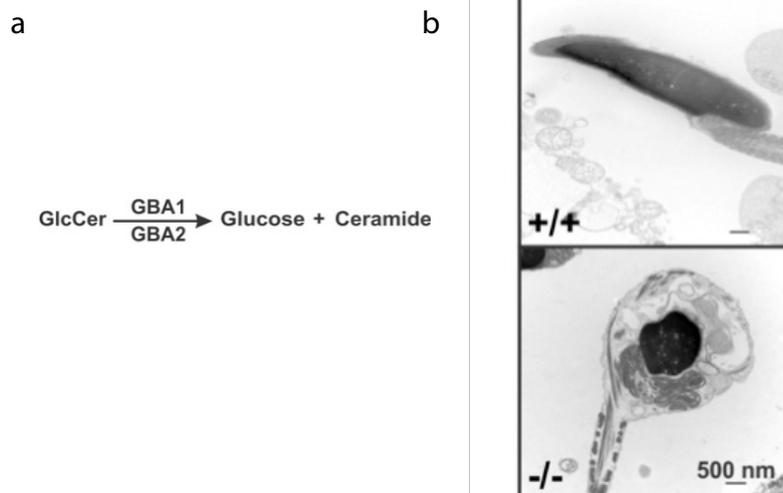


Abbildung 1. GBA2-Metabolismus und Globozoospermie. a. Umwandlung von GlcCer in Glukose und Ceramid durch GBA2. b. Elektronenmikroskopische Aufnahmen, die den Defekt in der Spermienmorphologie zeigen [2]. Oben: Wildtyp (+/+); unten: *GBA2-Knockout* (-/-). Maßstabsbalken: 500 nm.

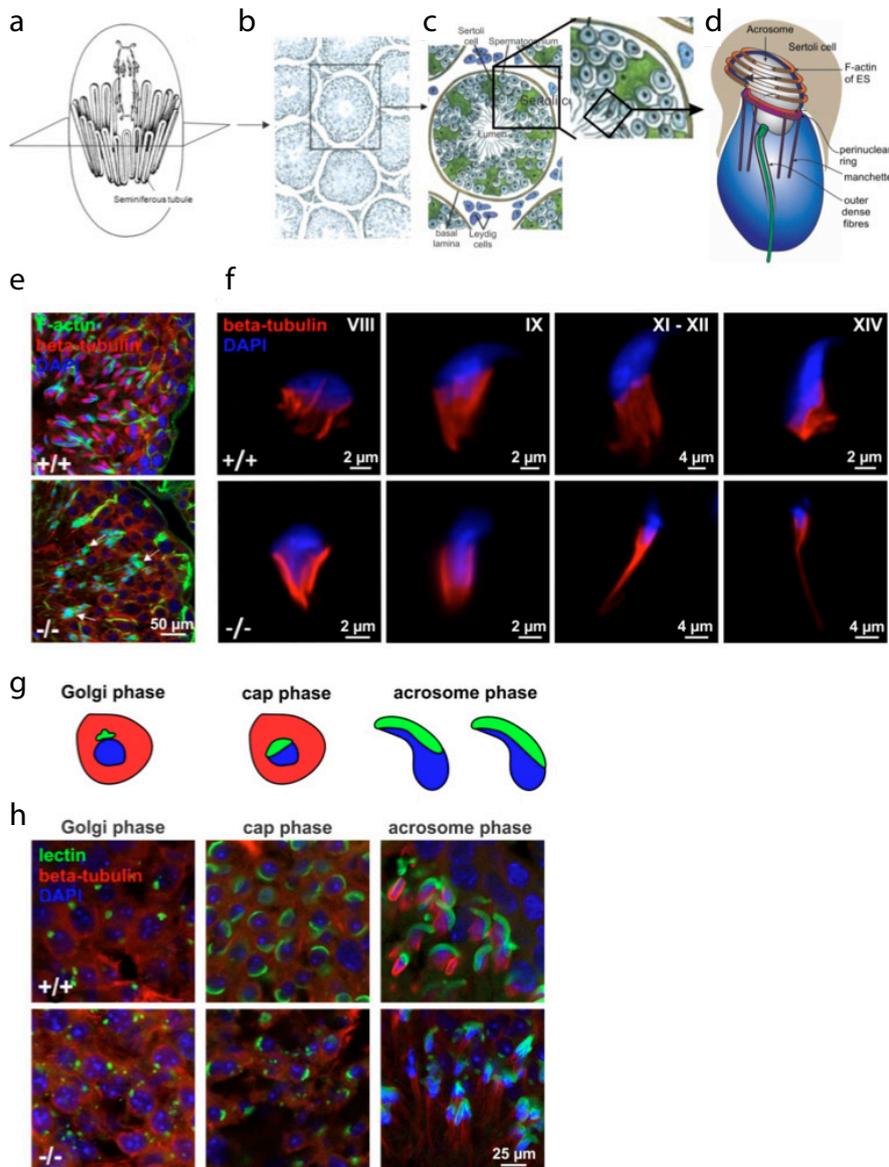


Figure 2: GlcCer accumulation causes cytoskeletal defects and acrosome deformation. **a.** Schematic representation of mouse testis with longitudinally arranged seminiferous tubules. **b.** Light microscopic view of a cross section through the testis. **c.** Schematic diagram of a cross section through a single tubule, showing Sertoli cells (green), different stages of developing spermatogonia (light blue), the basal lamina (brown), and Leydig cells (dark blue) [4]. **d.** Schematic representation of the structural components that shape the sperm head. The elongated spermatid (blue) is attached to the Sertoli cell (brown) via the apical ectoplasmic specialization (ES). The F-actin hoops (orange) of the ES shape the acrosomal region of the spermatid head. The spermatid microtubules (purple) form a manchette, consisting of a perinuclear ring supported by longitudinal microtubules around the spermatid neck that shape the postacrosomal region of the sperm head. The spermatid flagellum is shown in green. Diagram adapted from [5] and [6]. **e.** Immunofluorescent labeling of the cytoskeleton in wild-type (+/+) and GBA2 knockout-testis (-/-). Microtubules were labeled using an anti-beta tubulin antibody (red), F-actin using Alexa Fluor 488 Phalloidin (green), and the DNA using DAPI (blue). Defects in the F-actin structure are highlighted with arrows. Scale bars: 50 μm . [3] **f.** The manchette was stained with beta-tubulin antibody (red), DNA was labeled with DAPI (blue). Different developmental stages are indicated. [3] **g.** Schematic representation of acrosome formation which happens in three phases: Golgi phase – vesicles arising from the Golgi cluster at the spermatid nucleus, cap phase – the clustered vesicles fuse to form the acrosomal cap, and acrosome phase – the acrosomal cap spreads over the spermatid head. Acrosomal vesicles are depicted in green, DNA in blue, and the spermatid in red. **h.** Testis cross sections from wild type (+/+) and GBA2 knockout-mice (-/-) labeled with peanut-lectin to label the acrosome (green), an anti beta tubulin antibody (red), and DAPI to visualize DNA (blue). Scale bars: 25 μm . [3]

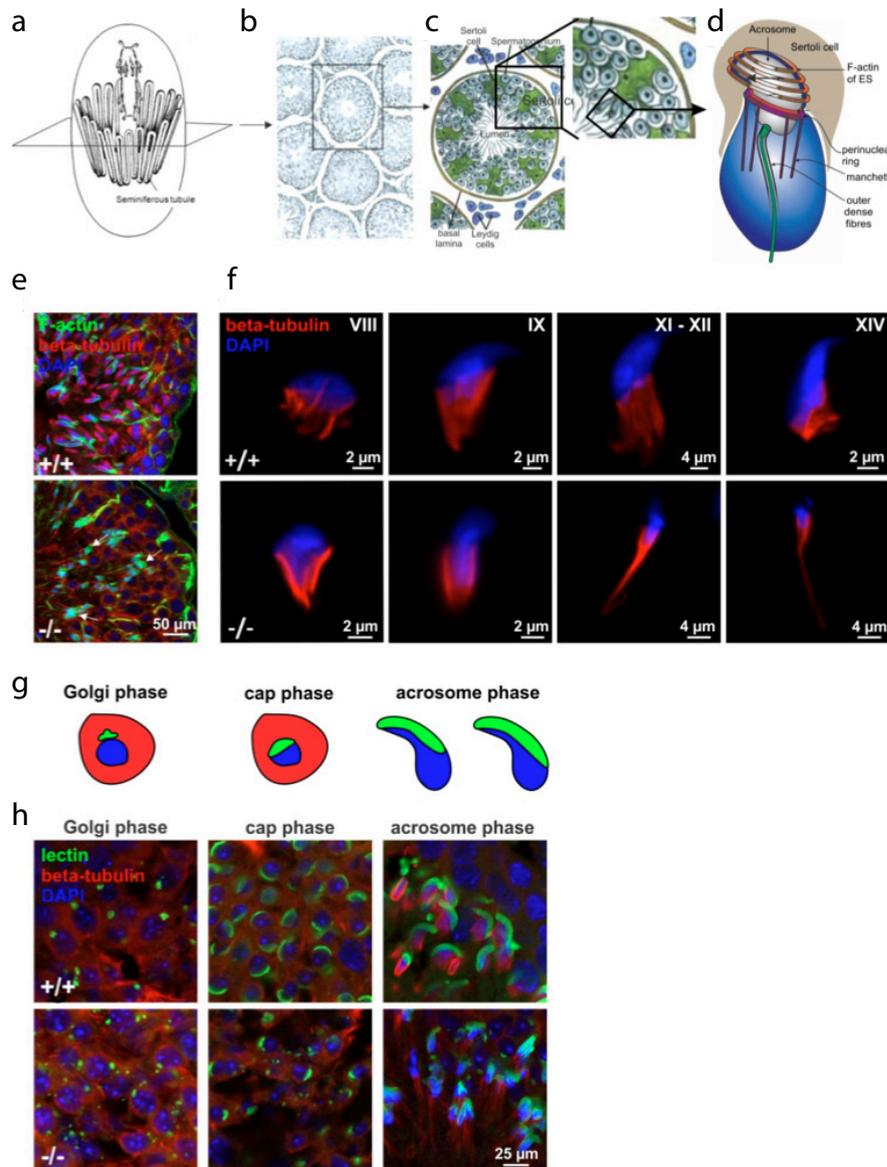


Abbildung 2. GlcCer-Anreicherung führt zu Defekten des Zytoskeletts und zur Akrosomdeformation. a. Schematische Darstellung eines Mäusehodens mit längsseitig angeordneten Samenkanälchen. b. Lichtmikroskopische Aufnahme eines Querschnitts durch den Hoden. c. Schematische Darstellung eines Querschnitts durch ein einzelnes Samenkanälchen, mit Sertoli-Zellen (grün), unterschiedlichen Stadien des sich entwickelnden Spermatogoniums (hellblau), Basallamina (braun) und Leydig-Zellen (dunkelblau) [4]. d. Schematische Darstellung der den Spermienkopf bildenden Strukturkomponenten. Das längliche Spermatid (blau) ist über die apikale ektoplasmatische Spezialisierung (ES) mit der Sertoli-Zelle (braun) verknüpft. Die F-Aktin-Ringe (orange) der ES bilden die akrosomale Region des Spermatidkopfes. Die Mikrotubuli des Spermatids (violett) formen eine Manschette; diese besteht aus einem perinukleären Ring mit längs um den Spermatidhals verlaufenden Mikrotubuli. Diese bilden die postakrosomale Region des Spermienkopfes. Die Spermatidgeißel ist grün dargestellt. Darstellung angelehnt an [5] und [6]. e. Immunfluoreszenz-Markierung des Zytoskeletts im Wildtyp- (+/+) und *GBA2-Knockout*-Hoden (-/-). Die Mikrotubuli wurden mit einem Anti-Beta-Tubulin-Antikörper (rot) markiert, F-Aktin mit Alexa Fluor 488 Phalloidin (grün) und die DNS mit DAPI (blau). Die Defekte in der Struktur des F-Aktins sind durch Pfeile gekennzeichnet. Maßstabsbalken: 50 μm . [3] f. Die Manschette wurde mit einem Beta-Tubulin-Antikörper (rot) angefärbt, die DNS mit DAPI (blau) markiert. Es sind jeweils die verschiedenen Entwicklungsstadien angegeben. [3] g. Schematische Darstellung der in drei Phasen ablaufenden Akrosomenbildung: Golgi-Phase – aus dem Golgi-Cluster am Spermatidkern entstehen Vesikel; Kappenphase – die Vesikel-Cluster verschmelzen zur Akrosomenkappe; Akrosomenphase – die Akrosomenkappe bedeckt den Spermatidkopf. Die akrosomalen Vesikel sind grün dargestellt, die DNS blau, das Spermatid rot. h. Querschnitte des Hodens von Wildtyp-Mäusen (+/+) und *GBA2-Knockout*-Mäusen (-/-), markiert mit Erdnusslektin zur Markierung des Akrosoms (grün), einem Anti-Beta-Tubulin-Antikörper (rot) und DAPI zur Sichtbarmachung der DNS (blau). Maßstabsbalken: 25 μm . [3]

In GBA2 knockout-mice, GlcCer accumulates in the testis. As a result, sperm display severe morphological defects: Heads are round rather than sickle-shaped, mitochondria are misaligned along the sperm flagellum, and the acrosome, needed to penetrate the egg coat, is lacking. This phenotype is called globozoospermia (figure 1b). These morphological defects such as globozoospermia are a leading cause of infertility in humans. However, the molecular pathogenesis underlying globozoospermia is poorly understood. Our question was: How does GlcCer accumulation affect sperm development?

Sperm development occurs in the seminiferous tubules of the testis (figure 2a-c). During the late stages, developing sperm – spermatids – undergo dramatic morphological changes: a round cell becomes an elongated sperm cell (figure 2c). These changes heavily rely on the close interaction between developing sperm and Sertoli cells, the cells that “nurse” sperm cells during development. The ectoplasmic specialization (ES) is a testis specific cell-cell junction that anchors the developing sperm head to Sertoli cells (figure 2c, d). Microscopic analysis of testis cross-sections revealed that in GBA2 knockout-mice, the actin bundles at the ES were disrupted (figure 2e) [3]. Also, microtubules of the spermatid manchette were longer in the GBA2 knockout mice, resulting in sperm with deformed heads (figure 2f) [3].

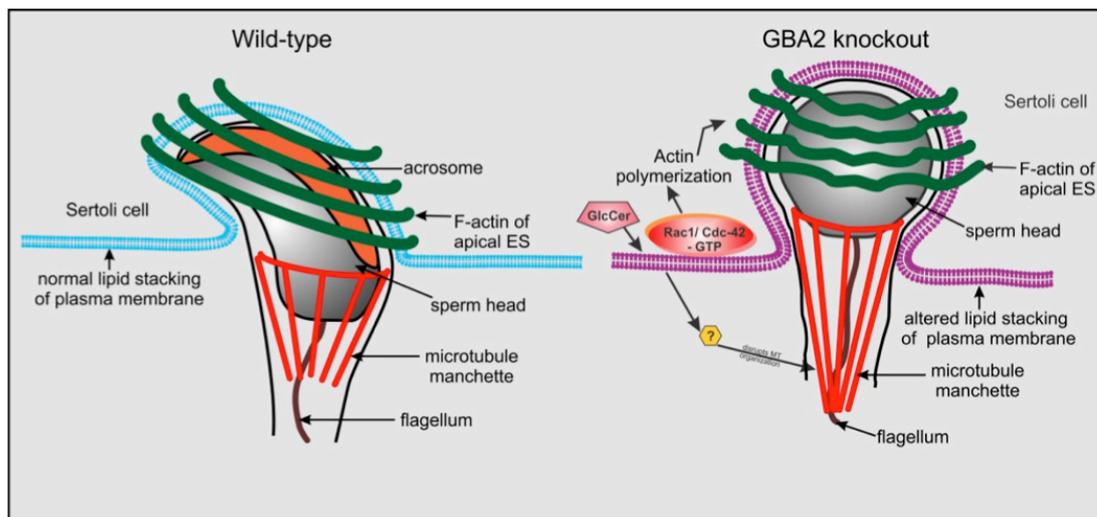


Figure 3: Sperm-head shaping in wild-type and GBA2 knockout-mice. **Left:** Schematic representation of the apical junction (ES) between a wild-type spermatid head and Sertoli cell. F-actin of the Sertoli cell at the apical ES (green) and the microtubule manchette of the spermatid (red) jointly shape the sperm head. As a result, sperm heads are sickle-shaped with a well formed acrosome (orange). The nucleus and the flagellum are indicated in grey and brown, respectively. **Right:** See left for GBA2 knockout-spermatid. GlcCer accumulation alters lipid stacking at the ES (purple) resulting in misregulation of Rac1/Cdc 42, thereby, disrupting F-actin alignment and rendering microtubules of the manchette more persistent. Therefore, sperm heads in the GBA2 knockout-mice are globozoospermic.

In männlichen *GBA2-Knockout*-Mäusen reichert sich GlcCer in den Hoden an. Als Folge weisen die Spermien schwere morphologische Defekte auf: Ihre Köpfe sind rund statt sichelförmig, die Mitochondrien entlang der Spermiengeißel sind falsch ausgerichtet und das für das Durchdringen der Eihülle notwendige Akrosom fehlt. Diesen Phänotyp bezeichnet man als Globozoospermie (Abbildung 1b). Morphologische Defekte wie die Globozoospermie sind einer der Hauptgründe für Unfruchtbarkeit beim Mann. Die zugrunde liegende molekulare Pathogenese versteht man jedoch bislang kaum. Mir stellte sich daher in meiner Doktorarbeit die Frage: Wie genau beeinflusst die Anreicherung von GlcCer die Spermienentwicklung?

Die Spermien entwickeln sich in den Samenkanälchen der Hoden (Abbildung 2, a-c). Es kommt bei sich entwickelnden Spermien – Spermatiden – zu dramatischen morphologischen Veränderungen: Die runde Zelle verwandelt sich in eine längliche Samenzelle (Abbildung 2c). Diese Veränderungen hängen stark von der engen Wechselwirkung zwischen dem Spermatid und den sogenannten Sertoli-Zellen – Stützzellen der Hodenkanälchen – ab. Bei der ektoplastischen Spezialisierung (ES) handelt es sich um eine hodenspezifische interzelluläre Schnittstelle (Abbildung 2c, d). Die mikroskopische Analyse von Hodenquerschnitten zeigt, dass die Aktinbündel an der ES bei *GBA2-Knockout*-Mäusen beschädigt sind (Abbildung 2e) [3]. Zudem sind

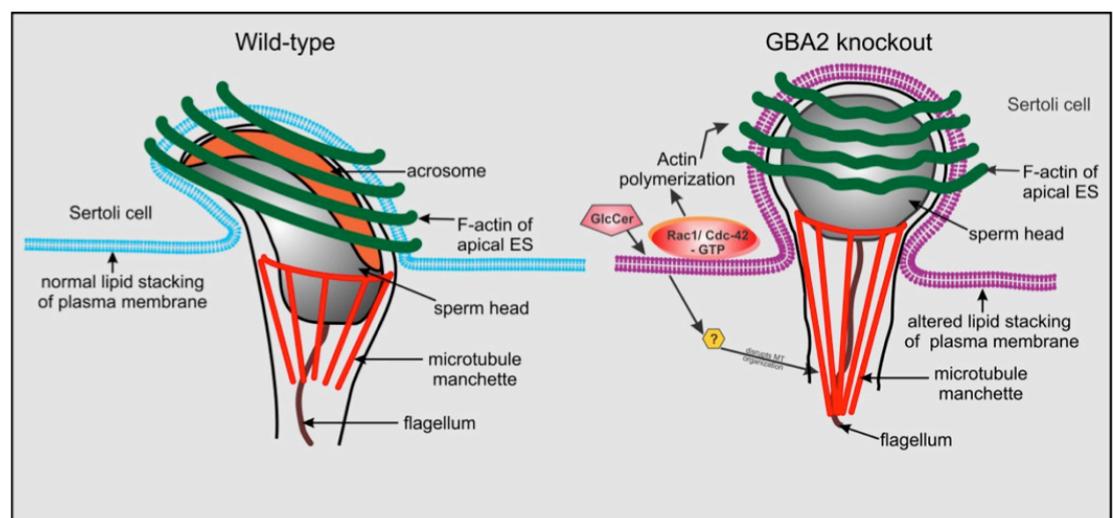


Abbildung 3. Bildung des Spermienkopfes bei Wildtyp- und *GBA2-Knockout*-Mäusen. Links: Schematische Darstellung der apikalen ektoplastischen Schnittstelle (ES) zwischen dem Kopf eines Wildtyp-Spermatids und einer Sertoli-Zelle. Das F-Aktin der Sertoli-Zelle an der apikalen ES (grün) und die Mikrotubuli-Manschette des Spermatids (rot) bilden gemeinsam den Spermienkopf. Als Folge sind die Spermienköpfe sichelförmig mit einem gut ausgebildeten Akrosom (orange). Der Kern und die Geißel sind grau bzw. braun dargestellt. Rechts: Wie links, für ein *GBA2-Knockout*-Spermatid. Die GlcCer-Anreicherung verändert die Lipidschichtung an der ES (violett), was zu einer Fehlfunktion von Rac1/Cdc-42 führt. Dies bewirkt, dass die Ausrichtung des F-Aktins gestört wird und die Mikrotubuli der Manschette eine längere Lebensdauer aufweisen. Die Spermienköpfe in den *GBA2-Knockout*-Mäusen sind damit Ausdruck einer Globozoospermie („Wasserköpfe“).

My results indicate that the accumulation of GlcCer in the testis of GBA2 knockout-mice disrupts the cytoskeletal dynamics, thereby, altering sperm-head shaping. The acrosome is an enzyme-filled organelle that is required for penetration of the egg coat to fertilize the egg. The accumulation of GlcCer in GBA2 knockout-mice also hinders fusion of acrosomal vesicles leading to acrosome deformation. See figure 2 for more details. To unravel the molecular mechanism underlying the defects observed during sperm development in the GBA2 knockout-mice, we used a cellular model system – mouse dermal fibroblasts. Similar to testis, fibroblasts express GBA2, accumulate GlcCer in the absence of GBA2 and, most strikingly, GBA2 knockout-fibroblasts also display cytoskeletal defects. My work reveals that the accumulation of GlcCer in the GBA2 knockout fibroblasts increases the packaging of lipids in the plasma membrane [3]. This in turn alters the activity of proteins associated with the plasma membrane, Cdc-42 and Rac1, which control actin and microtubule dynamics.

In summary, our work has shown that GlcCer accumulation in the absence of GBA2 leads to tightly-stacked lipids in the plasma membrane. This results in an increase in actin and microtubule polymerization – via misregulation of Cdc-42 and Rac1. In testis, this disrupts the ES and the spermatid manchette (figure 3), which are basically cytoskeletal structures. This – coupled to a defect in acrosome formation – results in globozoospermia [3].

Literatur

- [1] Körschen, H.G. *et al.* (2013) "The non-lysosomal beta-glucosidase GBA2 is a non-integral membrane-associated protein at the endoplasmic reticulum (ER) and Golgi" *J. Biol. Chem.* 288, 3381-3393.
- [2] Li, X. *et al.* (2013) "Electron counting and beam-induced motion correction enable near-atomic-resolution single-particle cryo-EM" *Nat. Meth.* 10, 584–590
- [3] Raju, D. *et al.* (2015) "Accumulation of Glucosylceramide in the Absence of the Beta Glucosidase GBA2 Alters Cytoskeletal Dynamics" *PLoS Genet.* 11, e1005063
- [4] Maronpot, R.R., Boorman, G.A. & Gaul, B.W. (1999) "Pathology of the Mouse: Reference and Atlas" *Cache River Press*
- [5] O'Donnell, L. *et al.* (2012) "An essential role for katanin p80 and microtubule severing in male gamete production" *PLoS Genet.* 8, e1002698
- [6] Kierszenbaum, A.L., Rivkin, E. & Tres, L.L. (2007) "Molecular biology of sperm head shaping" *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* 65, 33-43

die Mikrotubuli der Spermatidmanschette bei den GBA2-Knockout-Mäusen länger, was zu Spermien mit deformiertem Kopf ("Wasserkopf") führt (Abbildung 2f) [3].

Die Anreicherung von GlcCer in den Hoden von GBA2-Knockout-Mäusen stört die Dynamik des Zytoskeletts und die Bildung der Spermienköpfe. Beim Akrosom handelt es sich um eine enzymgefüllte Organelle, die erforderlich ist, damit das Spermium die Eihülle durchdringen kann. Die GlcCer-Anreicherung in GBA2-Knockout-Mäusen verhindert außerdem das Verschmelzen der akrosomalen Vesikel (Einzelheiten siehe Abbildung 2). Zur Klärung des molekularen Mechanismus, der den Defekten bei der Spermienentwicklung zugrunde liegt, verwendeten wir als Zellmodell dermale Maus-Fibroblasten. Ähnlich wie Hoden exprimieren auch Fibroblasten GBA2. Ohne GBA2 reichert sich GlcCer an. Am erstaunlichsten aber ist, dass GBA2-Knockout-Fibroblasten auch Defekte des Zytoskeletts aufweisen. Die Anreicherung von GlcCer in den GBA2-Knockout-Fibroblasten verstärkt zudem die Lipidschichtung in der Plasmamembran [3].

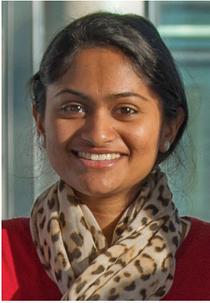
Zusammenfassend hat meine Arbeit gezeigt, dass die Anreicherung von GlcCer in Abwesenheit von GBA2 zur Folge hat, dass die Lipide in der Plasmamembran dichter geschichtet sind. Dies führt zu einer Zunahme der Aktin- und Mikrotubuli-Polymerisation. In der Folge werden in den Hoden die ektoplasmatische Spezialisierung und die Spermatidmanschette (Abbildung 3) beschädigt. In Verbindung mit einem Defekt bei der Akrosombildung führt dies zur Globozoospermie [3].

Literatur

- [1] Körschen, H.G. *et al.* (2013) "The non-lysosomal beta-glucosidase GBA2 is a non-integral membrane-associated protein at the endoplasmic reticulum (ER) and Golgi" *J. Biol. Chem.* 288, 3381-3393.
- [2] Li, X. *et al.* (2013) "Electron counting and beam-induced motion correction enable near-atomic-resolution single-particle cryo-EM" *Nat. Meth.* 10, 584-590
- [3] Raju, D. *et al.* (2015) "Accumulation of Glucosylceramide in the Absence of the Beta Glucosidase GBA2 Alters Cytoskeletal Dynamics" *PLoS Genet.* 11, e1005063
- [4] Maronpot, R.R., Boorman, G.A. & Gaul, B.W. (1999) "Pathology of the Mouse: Reference and Atlas" *Cache River Press*
- [5] O'Donnell, L. *et al.* (2012) "An essential role for katanin p80 and microtubule severing in male gamete production" *PLoS Genet.* 8, e1002698
- [6] Kierszenbaum, A.L., Rivkin, E. & Tres, L.L. (2007) "Molecular biology of sperm head shaping" *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* 65, 33-43

Diana Nancy Raju obtained her Bachelor's degree in Microbiology in 2007 and Master's degree in Biotechnology in 2009 from Mount Carmel College, Bangalore, India. In March 2009 she completed her master's thesis in collaboration with the Department of Biotechnology, Defence Bio-Engineering and Electro Medical Laboratory (DEBEL), Defence Research and Development Organization (DRDO) in Bangalore. Following this, she worked as a research assistant in the Department of Biochemistry, Indian Institute of Science until 2010. Since April 2011 she worked on her doctoral thesis at the Forschungszentrum caesar which she completed in September 2014. Currently, she pursues post-doctoral research in the Molecular Physiology group with PD Dr. Dagmar Wachten.





Diana Nancy Raju erwarb 2007 ihren Bachelor in Mikrobiologie und 2009 den Mastertitel in Biotechnologie (Mount Carmel College, Bangalore, Indien). Im März 2009 schloss sie ihre Masterarbeit in Zusammenarbeit mit dem Department of Biotechnology, Defence Bio-Engineering and Electro Medical Laboratory (DEBEL), Defence Research and Development Organization (DRDO) in Bangalore ab. Anschließend war sie bis 2010 als wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung für Biochemie am Indian Institute of Science tätig. Seit April 2011 arbeitete sie am Forschungszentrum caesar an ihrer Doktorarbeit, die sie im September 2014 abschloss. Aktuell ist sie als Postdoc in der Max-Planck-Forschungsgruppe Molekulare Physiologie von PD Dr. Dagmar Wachten tätig.

Pirouetting around the egg - three-dimensional navigation of sperm

Jan F. Jikeli

The egg cell releases an attractant to guide the movement of the sperm in a process known as chemotaxis. To date, this has been examined almost exclusively in confined quasi two-dimensional (2D) space. In most cases, however, chemotaxis occurs in three dimensions (3D). I wanted to take a much closer look at three-dimensional chemotaxis during my Ph.D. thesis.

Sperm do not reach the egg cell only by chance. They are attracted by chemical substances released by the egg. The chemoattractant is converted into a biochemical signal in the sperm cell that ultimately results in changes of the movement pattern of its tail, causing the sperm to follow the gradient of the attractant towards the egg.

Contact

Jan F. Jikeli
Research Center caesar
Department of
Molecular Sensory Systems
Project Group
Biophysics of Cell Motility
jan.jikeli@caesar.de

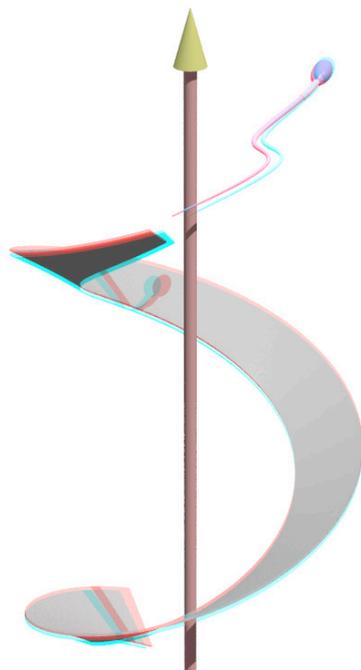


Figure 1: 3D model of a freely-swimming sperm consistent with my experimental recordings. Without stimulation, the sperm moves in a helical pattern. The illustration is best viewed using the 3D glasses provided.

In Pirouetten zur Eizelle – dreidimensionale Bahnen von Spermien

Jan F. Jikeli

Kontakt

Jan F. Jikeli
Forschungszentrum caesar
Abteilung
Molekulare Neurosensorik
Projektgruppe
Biophysik der Zellmotilität
jan.jikeli@caesar.de

Die Eizelle sendet Lockstoffe aus, die den Spermien den Weg weisen. Diesen Vorgang nennt man Chemotaxis. Er wurde bisher fast ausschließlich zweidimensional untersucht. In den meisten Fällen findet Chemotaxis jedoch im dreidimensionalen Raum statt. Dieser 3D-Chemotaxis wollte ich in meiner Doktorarbeit auf den Grund gehen.

Spermien finden die Eizelle nicht zufällig. Sie werden durch chemische Stoffe angelockt, die von der Eizelle abgegeben werden. Der Lockstoffreiz wird in den Spermien in ein biochemisches Signal umgewandelt. Dadurch ändert sich das Schlagmuster des Spermischwanzes; die Spermien schwimmen entlang des Lockstoffgradienten zur Eizelle hin.

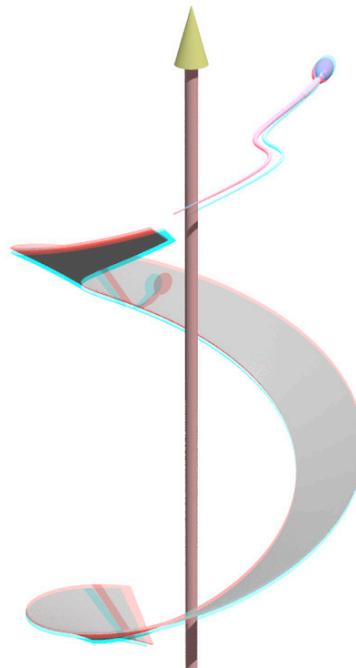


Abbildung 1: 3D-Modell eines frei schwimmenden Spermiums. Ohne Stimulation bewegt sich das Spermium auf einer helikalen Bahn. Die Abbildung lässt sich am besten mit der beigefügten 3D-Brille betrachten.

To date, the movement of sperm has been examined almost exclusively in two dimensions, using thin observation chambers. Physiologically, 2D sperm chemotaxis is important: The surface of the egg, across which some fish sperm swim, is a curved plane. In most cases, however, chemotaxis occurs in 3D. During my Ph.D. thesis, I wanted to take a closer look at 3D sperm chemotaxis.

For the experiments, I used sea urchin sperm from the species *Arbacia punctulata*. In thin observation chambers, sea urchin sperm swim on the surface of the glass wall. In the ocean though, sea urchin sperm and eggs are released into the 3D space of the sea, where fertilization takes place. It has long been understood that freely-swimming sperm swim in helical 3D patterns. How is the 3D helical pattern altered to reach the egg? To find the answer to this question, initially we worked with Dr. Wilson of the Rowland Institute at Harvard to develop a digital inline holographic microscope (DIHM) to view the helical 3D swimming pattern. This microscope allowed us to observe the freely-swimming sperm at a high spatio-temporal resolution.

To explain how sperm find the egg, we delved into the chemical box of tricks and used the so-called caged compounds, and in particular, we made use of a caged chemoattractant. This chemical substance contains, in addition to the chemoattractant, a chemical group that locks the attractant into a chemical “cage”. Consequently, the sperm do not recognize the modified attractant. However, the cage can be opened with a flash of UV light to produce, by light, a chemoattractant gradient. In this way, we were able to generate 3D gradients of defined concentration in time and space, and, for the first time, observe freely-swimming sperm in a precisely known 3D attractant landscape. What did we observe? Sperm steer in a gradient following the chemoattractant concentration that they encounter, but they respond to two different components of the stimulus. From the periodic motion in a helix, they sense highs and lows in the chemoattractant stimulus, and they use this information to know when to move to swim up the gradient. Say: The time point when the sperm leave its purely helical swimming path and approaches the egg, is determined by the individual helical loops themselves. The strength of the correction direction, however, is determined by the long-term average stimulus. When sperm sense that the first strategy does not suffice, they can perform major corrections of their swimming path (figure 2). Finally, we have managed in a close collaboration with Dr. B. Friedrich from the Max Planck Institute for the Physics of Complex Systems in Dresden, to combine these two factors in a single theoretical model for chemotaxis.

Thus, we understood the cellular strategy that shapes the paths along which freely-swimming sperm locate the egg. But what actually drives them forward? The movement of the sea-urchin sperm tail has hitherto only been described in 2D. It

Bisher wurde die gesteuerte Bewegung von Spermien fast ausschließlich zwei-dimensional in flachen Beobachtungskammern untersucht. 2D-Chemotaxis ist physiologisch durchaus relevant: Die Eioberfläche, auf der beispielsweise Fischspermien schwimmen, ist eine gekrümmte Ebene. In den meisten Fällen findet Chemotaxis von Spermien jedoch im dreidimensionalen Raum statt. Dieser 3D-Chemotaxis wollte ich in meiner Doktorarbeit auf den Grund gehen.

Für die Untersuchungen habe ich Spermien des Seeigels *Arbacia punctulata* verwendet. In flachen Beobachtungskammern schwimmen Seeigel-Spermien auf Kreisbahnen entlang der Glaswand. Im Meer entlassen Seeigel die Spermien und Eizellen jedoch einfach ins Wasser. Die Befruchtung findet außerhalb des Körpers statt – in einem sehr großen Volumen. Seit langem ist bekannt, dass sich frei bewegende Spermien auf einer helikalen 3D-Bahn schwimmen. Wie aber finden Spermien die Eizelle im dreidimensionalen Raum? Um diese Frage zu beantworten, haben wir zunächst – in Kooperation mit Dr. Wilson vom Rowland Institute in Harvard – ein digitales Inline-Holographisches Mikroskop (DIHM) für die Aufnahme der helikalen 3D-Bahnen entwickelt. Dieses Mikroskop erlaubte es uns, frei schwimmende Spermien mit einer hohen zeitlich-räumlichen Auflösung zu beobachten.

Um aufzuklären, wie die Spermien die Eizelle finden, haben wir in die chemische Trickkiste gegriffen: Wir haben sogenannte *caged compounds*, „Käfigverbindungen“, verwendet. Diese enthalten neben dem Lockstoff eine chemische Gruppe, die den Lockstoff in einen chemischen „Käfig“ sperrt. So können die Spermien den Lockstoff nicht erkennen. Der Käfig lässt sich durch einen UV-Lichtblitz öffnen. Dadurch konnten wir die Konzentration des Lockstoffs räumlich und zeitlich genau bestimmen und zum ersten Mal frei schwimmende Spermien in einem dreidimensionalen Lockstoffgradienten beobachten. Was haben wir beobachtet? Die Richtungskorrektur, weg von einer rein helikalen Schwimmbahn, hin zur Lockstoffquelle, erfolgt durch schnelle als auch langsame Mechanismen. Die sich periodisch wiederholenden Schlaufen der helikalen Bahn bestimmen kurzfristig den *Zeitpunkt* der Richtungskorrektur. Sprich: Wann das Spermium von seiner regelmäßigen helikalen Schwimmbahn abweicht und sich der Eizelle nähert, wird durch die einzelnen Schlaufen selbst festgelegt. Die *Stärke* der Richtungskorrektur hingegen wird längerfristig durch die gemittelte helikale Bahn bestimmt: Je näher das Spermium an der Eizelle ist, desto stärker muss die Richtung korrigiert werden (Abbildung 2). Es ist uns gelungen in enger Zusammenarbeit mit Dr. B. Friedrich vom Max-Planck-Institut für Physik komplexer Systeme, diese beiden Faktoren in einem einzigen Chemotaxis-Modell zusammenzufassen.

Wir wussten nun, auf welchen Bahnen sich frei schwimmende Spermien der Eizelle nähern. Doch wie werden sie überhaupt vorangetrieben? Der Schlag des Schwanzes

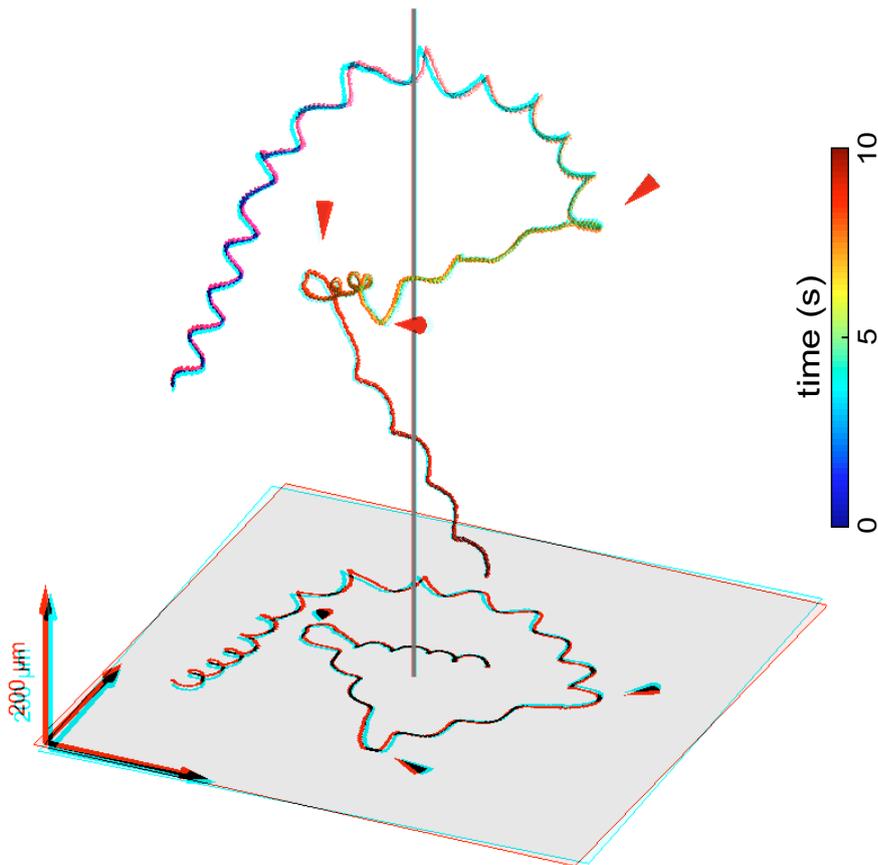


Figure 2: Sperm chemotaxis in a 3D attractant gradient recorded with a holographic microscope. The gray line indicates the central axis of the gradient. At first, the sperm cell swims in a perfect helix. When the cell approaches the attractant gradient, the helical path veers towards the central axis. If small adjustments to the swimming direction don't suffice to bring the cell up the gradient, and eventually sperm veers off course, a sudden change of direction occurs (see arrows). The illustration is best viewed using the 3D glasses provided. The color bar indicates the time.

is impossible, however, that a 2D movement of the sperm tail leads to a helical 3D swimming path. Why has this not been examined before? The maximum frame rate of conventional 3D microscopes is 20 images per second. Sperm tails, however, beat at a rate of 50 times per second. In order to describe the 3D movement, therefore, a new microscopy method was required. We developed a multi-focal microscope, with which we were able to record several optical planes simultaneously on one camera chip. With this microscope and the previously mentioned DIHM, we had two alternative methods to uncover the 3D movement of the sperm tail with the required spatial and temporal resolution. Using both methods, we were able to determine consistently that the movement of the tail of sea urchin sperm is not just 2D but also 3D, although the deviation into the third dimension is slight. In a further step, we looked at how the 3D tail movement is affected by chemotactic

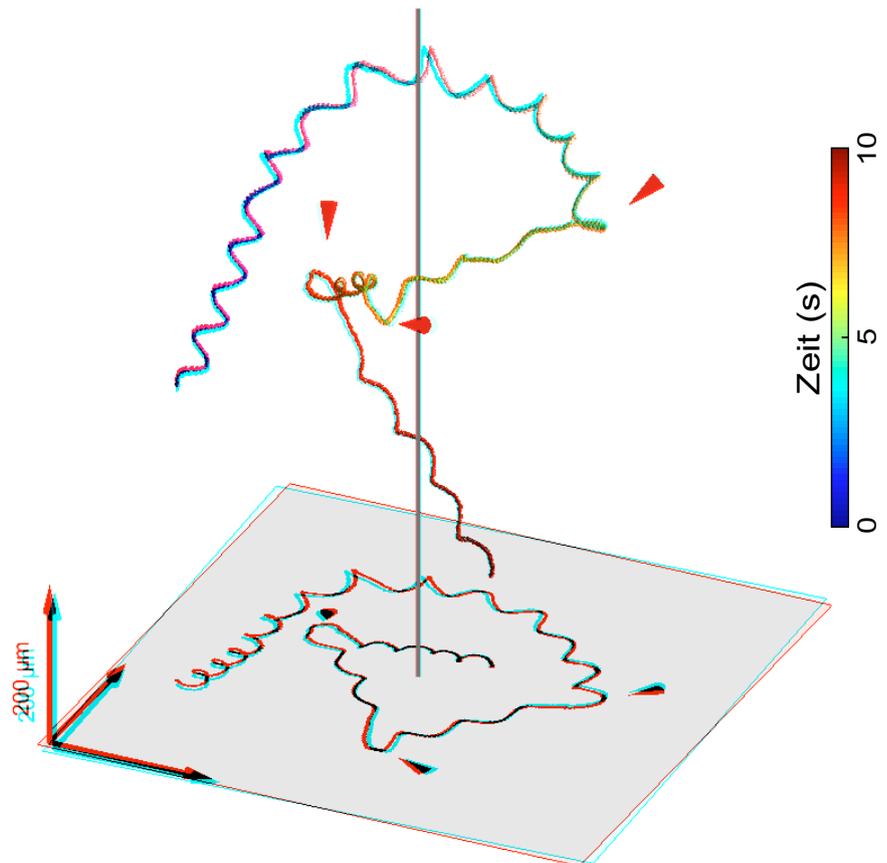


Abbildung 2: Spermien-Chemotaxis in einem 3D-Lockstoff-Gradienten. Die graue Linie stellt das Zentrum des Gradienten dar. Zunächst schwimmt das Spermium auf einer perfekten Helix. Wenn sich das Spermium dem Lockstoff nähert, neigt sich die helikale Bahn zum Zentrum hin. Wenn kleine Korrekturen der Schwimmrichtung nicht genügen und das Spermium den Kurs verlässt, erfolgt ein abrupter Richtungswechsel (Pfeile). Die Abbildung lässt sich am besten mit der beigefügten 3D-Brille betrachten.

von Seeigelspermien wurde bislang nur zweidimensional beschrieben. Es ist jedoch offensichtlich, dass ein zweidimensionaler Schwanzschlag nicht zu einer helikalen 3D-Schwimbahn führen kann. Bislang war es jedoch nicht möglich, den dreidimensionalen Schlag des Spermischwanzes zu untersuchen. Woran liegt das? Herkömmliche 3D-Mikroskopie-Verfahren können ein Objekt höchstens 20 Mal in der Sekunde aufnehmen. Spermien schlagen ihren Schwanz jedoch bis zu 50 Mal in der Sekunde. Um den Schlag dreidimensional zu beschreiben, waren somit neue Mikroskopie-Verfahren notwendig. Wir haben ein multifokales Mikroskop entwickelt, mit dem wir mehrere Ebenen gleichzeitig auf einem Kamerachip aufnehmen können. Mit diesem multifokalen Mikroskop und dem oben erwähnten DIHM standen uns nun zwei Möglichkeiten offen, den 3D-Schlag des Spermischwanzes zu messen. Mit beiden Methoden konnten wir übereinstimmend feststellen, dass

stimulation, and we were able to show the precise 3D movement of the sperm tail that takes place upon stimulation sperm.

For my Ph.D. thesis, I developed various procedures to observe the 3D movement of swimming sperm. These procedures can also be used in the future to investigate chemotaxis, phototaxis, or rheotaxis among a vast number of swimming micro-organism.



Jan F. Jikeli studied general physics at the University of Cologne and was awarded his degree in September 2009. He completed his thesis on microvascular imaging in pathological tissue at the Max Planck Institute for Neurological Research, in Prof. Hoehn's Research Group. For his doctoral work, he relocated to Bonn to the Molecular Sensory Systems Department, working with Prof. U. B. Kaupp and Dr. L. Alvarez at the Research Center caesar. Here, he developed methods to examine the rapid 3D movement of cells and, using these methods, he investigated the navigation of sperm in 3D chemoattractant landscapes. In January 2015, he received his doctorate from the University of Cologne.

der Schlag des Schwanzes von Seeigelspermien tatsächlich nicht zwei-, sondern auch dreidimensional ist, auch wenn die Auslenkung in der dritten Dimension gering ist. In einem nächsten Schritt untersuchten wir, wie sich der 3D-Schlag nach chemotaktischer Stimulation ändert. Dazu verwendeten wir wieder die *caged compounds*. Wir konnten zeigen, dass der Schwanz nach der Stimulation in allen drei Raumrichtungen kurzzeitig asymmetrisch schlägt.

In meiner Promotion habe ich somit verschiedene Verfahren entwickelt, um die 3D-Schwimmbewegung von Spermien beobachten zu können. Diese Verfahren können zukünftig auch dazu verwendet werden, um Chemotaxis, Phototaxis oder Rheotaxis an Mikroschwimmern aller Art zu untersuchen.



Jan F. Jikeli hat Allgemeine Physik an der Universität zu Köln studiert und erhielt im September 2009 sein Diplom. Seine Diplomarbeit fertigte er am Max-Planck-Institut für neurologische Forschung in der Arbeitsgruppe von Prof. Hoehn zu dem Thema Mikrogefäßbildung in pathologischen Gewebe an. Für seine Promotion wechselte er nach Bonn in die Abteilung Molekulare Neurosensorik von Prof. U. B. Kaupp ans Forschungszentrum caesar und arbeitete dort in der Projektgruppe von Dr. L. Alvarez. Hier entwickelte er Methoden zur Untersuchung von schnellen 3D-Bewegungen und erforschte mit diesen Methoden die 3D-Navigation von Spermien. Im Januar 2015 erhielt er seinen Dokortitel von der Universität zu Köln.

Publikationen
Publications

- Al Haj, A., Mazur, A.J., Radaszkiewicz, K., Radaszkiewicz, T., Makowiecka, A., Stopschinski, B.E., Schönichen, A., Geyer, M. & Mannherz, H.G. (2014) "Distribution of formins in cardiac muscle: FHOD1 is a component of intercalated discs and costameres" *Eur. J. Cell Biol.* 94, 101-113
- Alvarez, L., Friedrich, B.M., Gompper, G. & Kaupp, U.B. (2014) "The computational sperm cell" *Trends Cell Biol.* 24, 198-207
- Börger, C., Schünke, S., Lecher, J., Stoldt, M., Winkhaus, F., Kaupp, U.B. & Willbold, D. (2014) "Resonance assignment of the ligand-free cyclic nucleotide-binding domain from the murine ion channel HCN2" *Biomol. NMR Assig.*, [Epub ahead of print]
- Bösken, C.A., Farnung, L., Hintermair, C., Merzel Schachter, M., Vogel-Bachmayr, K., Blazek, D., Anand, K., Fisher, R.P., Eick, D. & Geyer, M. (2014) "The structure and substrate specificity of human Cdk12/Cyclin K" *Nat. Commun.* 5, 3505
- Brenker, C., Zhou, Y., Muller, A., Echeverry, F.A., Trotschel, C., Poetsch, A., Xia, X.M., Bonigk, W., Lingle, C.J., Kaupp, U.B. & Strünker, T. (2014) "The Ca²⁺-activated K⁺ current of human sperm is mediated by Slo3" *eLife* 3, e01438
- Brückner, M., Schnaars, M., Baqi, Y., Muller, C.E. & Halle, A. (2014) "Microglial purinergic receptors in Alzheimer's disease" *Purinergic Signalling* 10, 724-725
- Cui, H.L., Ditiatkovski, M., Kesani, R., Bobryshev, Y.V., Liu, Y., Geyer, M., Mukhamedova, N., Bukrinsky, M. & Sviridov, D. (2014) "HIV protein Nef causes dyslipidemia and formation of foam cells in mouse models of atherosclerosis" *FASEB J.* 28, 2828-2839
- Gruning, C.S., Mirecka, E.A., Klein, A.N., Mandelkow, E., Willbold, D., Marino, S.F., Stoldt, M. & Hoyer, W. (2014) "Alternative conformations of the Tau repeat domain in complex with an engineered binding protein" *J. Biol. Chem.* 289, 23209-23218
- Itzen, F., Greifenberg, A.K., Bösken, C.A. & Geyer, M. (2014) "Brd4 activates P-TEFb for RNA polymerase II CTD phosphorylation" *Nucleic. Acids. Res.* 42, 7577-7590
- Karagoz, G.E., Duarte, A.M.S., Akoury, E., Ippel, H., Biernat, J., Luengo, T.M., Radli, M., Didenko, T., Nordhues, B.A., Veprintsev, D.B., Dickey, C.A., Mandelkow, E., Zweckstetter, M., Boelens, R., Madl, T. & Rudiger, S.G.D. (2014) "Hsp90-Tau complex reveals molecular basis for specificity in chaperone action" *Cell* 156, 963-974
- Kluge, S.F., Mack, K., Iyer, S.S., Pujol, F.M., Heigele, A., Learn, G.H., Usmani, S.M., Sauter, D., Joas, S., Hotter, D., Bibollet-Ruche, F., Plenderleith, L.J., Peeters, M., Geyer, M., Sharp, P.M., Fackler, O.T., Hahn, B.H. & Kirchhoff, F. (2014) "Nef proteins of epidemic HIV-1 group O strains antagonize human tetherin" *Cell Host Microbe* 16, 639-650
- Kühn, S. & Geyer, M. (2014) "Formins as effector proteins of Rho GTPases" *Small GTPases* 5, e29513

Kumar, S., Tepper, K., Kaniyappan, S., Biernat, J., Wegmann, S., Mandelkow, E.M., Muller, D.J. & Mandelkow, E. (2014) "Stages and conformations of the Tau repeat domain during aggregation and its effect on neuronal toxicity" *J. Biol. Chem.* 289, 20318-20332

Kurth, P., Pattai, S. & Rudolph, D. (2014) "Artifact-free, long-lasting phase plate" *Microsc. Microanal.* 20, 220-221

Li, T., Lohmann, F. & Famulok, M. (2014) "Interlocked DNA nanostructures controlled by a reversible logic circuit" *Nat. Commun.* 5, 4940

Lohmann, F., Weigandt, J., Valero, J. & Famulok, M. (2014) "Logic Gating by Macrocyclic Displacement Using a Double-Stranded DNA 3 Rotaxane Shuttle" *Angew. Chem.-Int. Edit.* 53, 10372-10376

Lülf, S., Matz, J., Rouyez, M.C., Jarviluoma, A., Saksela, K., Benichou, S. & Geyer, M. (2014) "Structural basis for the inhibition of HIV-1 Nef by a high-affinity binding single-domain antibody" *Retrovirology* 11, 24

Mass, E., Wachten, D., Aschenbrenner, A.C., Voelzmann, A. & Hoch, M. (2014) "Murine Creld1 Controls Cardiac Development through Activation of Calcineurin/NFATc1 Signaling" *Dev. Cell* 28, 711-726

Matenia, D. & Mandelkow, E.M. (2014) "Emerging modes of PINK1 signaling: another task for MARK2" *Front. Mol. Neurosci.* 7, 37

Mejia, Y.X., Feindt, H., Zhang, D., Steltenkamp, S. & Burg, T.P. (2014) "Microfluidic cryofixation for correlative microscopy" *Lab on a Chip* 14, 3281-3284

Michel, C.H., Kumar, S., Pinotsi, D., Tunnacliffe, A., St George-Hyslop, P., Mandelkow, E., Mandelkow, E.M., Kaminski, C.F. & Schierle, G.S.K. (2014) "Extracellular monomeric Tau protein is sufficient to initiate the spread of Tau protein pathology" *J. Biol. Chem.* 289, 956-967

Mony, L., Berger, T. & Isacoff, E.Y. (2014) "The specialized role of the S1 transmembrane segment in the gating of the Hv1 proton channel" *Biophys. J.* 106, 233A-233A

Pichlo, M., Bungert-Plumke, S., Weyand, I., Seifert, R., Bönigk, W., Strünker, T., Kashikar, N.D., Goodwin, N., Müller, A., Pelzer, P., Van, Q., Enderlein, J., Klemm, C., Krause, E., Trotschel, C., Poetsch, A., Kremmer, E. & Kaupp, U.B. (2014) "High density and ligand affinity confer ultrasensitive signal detection by a guanylyl cyclase chemoreceptor" *J. Cell. Biol.* 206, 541-557

Pokrant, S., Cheynet, M.C., Irsen, S., Maegli, A.E. & Erni, R. (2014) "Mesoporosity in photocatalytically active oxynitride single crystals" *J. Phys. Chem. C* 118, 20940-20947

- Ritter, L., Palmer, J., Bindl, A., Irsen, S., Cizek, J., Karapetian, V.E. & Zoller, J.E. (2014) "Accuracy of chairside-milled CAD/CAM drill guides for dental implants" *Int. J. Comput. Dent.* 17, 115-124
- Schiffer, C., Müller, A., Egeberg, D.L., Alvarez, L., Brenker, C., Rehfeld, A., Frederiksen, H., Wäschle, B., Kaupp, U.B., Balbach, M., Wachten, D., Skakkebaek, N.E., Almstrup, K. & Strünker, T. (2014) "Direct action of endocrine disrupting chemicals on human sperm" *EMBO Rep.* 15, 731 - 815
- Scholz, T. & Mandelkow, E. (2014) "Transport and diffusion of Tau protein in neurons" *Cell Mol. Life Sci.* 71, 3139-3150
- Schulze, N., Graessl, M., Blancke Soares, A., Geyer, M., Dehmelt, L. & Nalbant, P. (2014) "FHOD1 regulates stress fiber organization by controlling transversal arc2 and dorsal fiber dynamics" *J. Cell Sci.* 127, 1379-1393
- Schwalbe, M., Ozenne, V., Bibow, S., Jaremko, M., Jaremko, L., Gajda, M., Jensen, M.R., Biernat, J., Becker, S., Mandelkow, E., Zweckstetter, M. & Blackledge, M. (2014) "Predictive atomic resolution descriptions of intrinsically disordered hTau40 and α -synuclein in solution from NMR and small angle scattering" *Structure* 22, 238-249
- Siebke, G., Gerngroß, K., Holik, P., Schmitz, S., Rohloff, M., Tätzner, S. & Steltenkamp, S. (2014) "An uncooled capacitive sensor for IR detection" *Proc. SPIE Infrared Technology and Applications XL Baltimore, Maryland, USA (24.06.2014)* 9070
- Siebke, G., Holik, P., Schmitz, S., Schmitz, H., Lacher, M. & Steltenkamp, S. (2014) „A model for mu-biomimetic thermal infrared sensors based on the infrared receptors of *Melanophila acuminata*" *Bioinspir. Biomim.* 9, 036012
- Stutz, A., Horvath, G.L., Stahl, R., Franklin, B.S., Kolbe, C.C.L., Geyer, M., Meissner, F. & Latz, E. (2014) "The NLRP3 inflammasome is regulated by phosphorylation and ubiquitylation" *Cytokine* 70, 70-71
- Tepper, K., Biernat, J., Kumar, S., Wegmann, S., Timm, T., Hubschmann, S., Redecke, L., Mandelkow, E.M., Muller, D.J. & Mandelkow, E. (2014) "Oligomer formation of tau protein hyperphosphorylated in cells" *J. Biol. Chem.* 289, 34389-343407
- von Cube, F., Niegemann, J., Irsen, S., Bell, D.C. & Linden, S. (2014) "Angular-resolved electron energy loss spectroscopy on a split-ring resonator" *Phys. Rev. B* 89
- Yamada, K., Holth, J.K., Liao, F., Stewart, F.R., Mahan, T.E., Jiang, H., Cirrito, J.R., Patel, T.K., Hochgrafe, K., Mandelkow, E.M. & Holtzman, D.M. (2014) "Neuronal activity regulates extracellular tau in vivo" *J. Exp. Integr. Med.* 211, 387-393
- Zempel, H. & Mandelkow, E. (2014) „Lost after translation: missorting of Tau protein and consequences for Alzheimer disease" *Trends Neurosci.* 37, 721-732

Dissertationen

Mukherjee, S. "A study on structural dynamics of a cyclic nucleotide-binding domain during ligand binding", Dissertation: Mathematisch- Naturwissenschaftliche Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn (2014)

Overbuschmann, J. "Fabrication of fresnel zone plates for soft x-ray and EUV microscopy by ion beam lithography", Dissertation: Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn (2014)

Raju, D. "Non-lysosomal accumulation of glucosylceramide alters cytoskeletal dynamics causing globozoospermia", Dissertation: Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Rheinischen-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn (2014)

von Cube, F. "Near field characterization of plasmonic nanostructures with electron energy loss spectroscopy", Dissertation: Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn (2014)

Weiche, B. "Biochemical and structural studies of the interaction between ARNO and the epidermal growth factor receptor", Dissertation: Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn (2014)



Personal

Personalstruktur

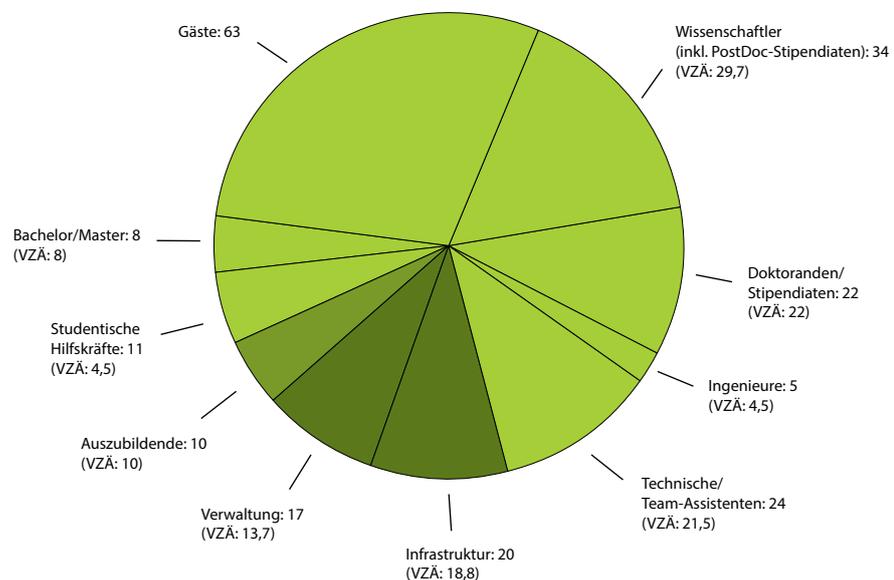
Bei der Stiftung caesar waren zum 1.1.2015 insgesamt 214 Personen beschäftigt (151 caesar-Mitarbeiter/innen und 63 Gastwissenschaftler/innen). Das Vollzeitäquivalent lag bei 195,7 Stellen.

Damit setzt sich der Personalzuwachs von caesar kontinuierlich weiter fort:

1.1.2010:	105 Personen
1.1.2011:	120 Personen
1.1.2012:	155 Personen
1.1.2013:	170 Personen
1.1.2014:	198 Personen
1.1.2015:	214 Personen

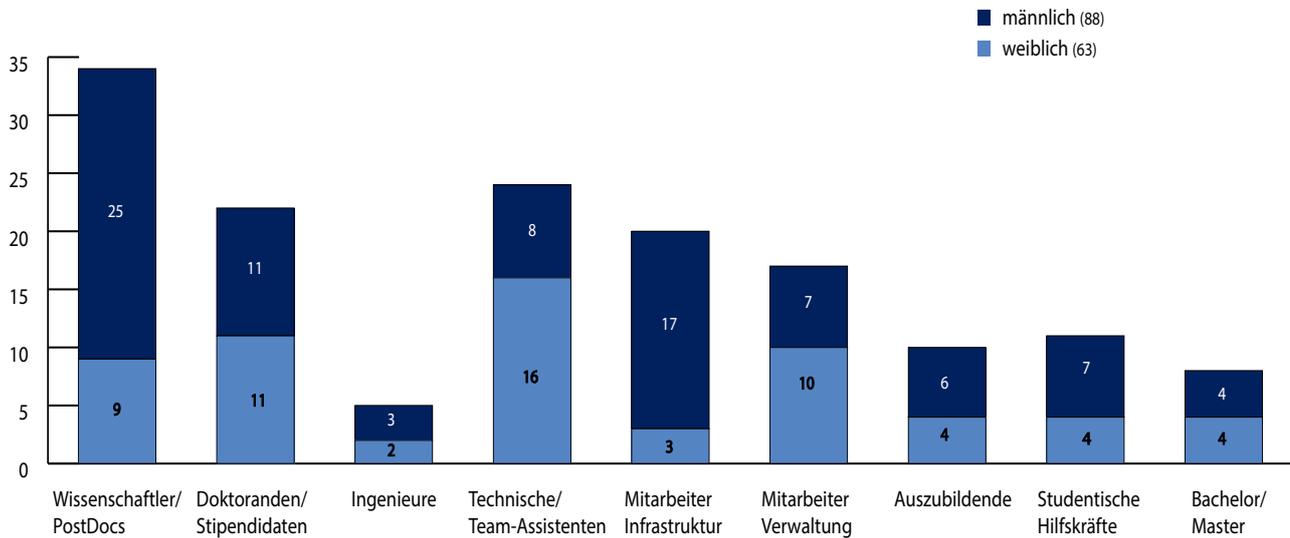
Die Verteilung der Beschäftigten auf die einzelnen Funktionsbereiche ergibt sich aus der unten stehenden Grafik. Danach sind 167 der Beschäftigten im wissenschaftlichen Bereich, 17 in der Verwaltung und 20 in der Infrastruktur beschäftigt. Ferner bildet caesar 10 Auszubildende in sechs Bereichen aus.

Beschäftigte nach Funktionen, Stand: 01.01.2015





Caesar konnte den Anteil der weiblichen Beschäftigten im vergangenen Jahr halten. 42 % der caesar-Mitarbeiter sind weiblich. Insbesondere im wissenschaftlichen Bereich ist geplant, diesen Anteil noch weiter zu erhöhen. Die Aufteilung von weiblichen und männlichen Mitarbeitern, bezogen auf die einzelnen Funktionsbereiche, ist in der unten stehenden Grafik dargestellt.



Caesar hält seine Ausbildungsbemühungen auf hohem Niveau und hatte in den letzten zwei Jahren mehrere Auszubildende, die als Kammerbeste vor der IHK ihre Prüfungen abgelegt haben. Die Gesamtzahl der Studenten/innen, Auszubildenden und Doktoranden/innen beträgt 51. Sie stellen damit ein Drittel aller Mitarbeiter/innen.

Finanzen

Grundstock der Stiftung caesar

Caesar wurde als gemeinnützige Stiftung des privaten Rechts von der Bundesrepublik Deutschland und dem Land Nordrhein-Westfalen, im Rahmen des Bonn-Berlin-Ausgleichs, gegründet.

Das Stiftungsvermögen beträgt 383,4 Mio. € plus 6,6 Mio. € Grundstückswert, den caesar von der Stadt Bonn erhalten hat.

286,3 Mio. € des Stiftungskapitals wurden langfristig am Kapitalmarkt angelegt. Die Erträge finanzieren unter anderem die Forschung bei caesar.

Vermögen

Sachanlagen	85.916.996 €
Finanzanlagen	302.039.602 €
Sonstige	19.658.035 €
Bilanzsumme	407.614.633 €

Erträge 2014

Erträge aus Umsatzerlösen und Förderprojekten	3.567.336 €
Erträge aus Wertpapieren und Zinsen	12.183.233 €
Erträge insgesamt	15.750.569 €

Aufwendungen 2014

Personalaufwand	6.692.913 €
Sachaufwand	5.184.124 €
Abschreibungen	3.257.440 €
Aufwendungen insgesamt	15.134.477 €

Jahresbilanz 2014

Bilanzabschluss zum 31.12.2014 (Angaben in €)

Aktiva	31.12.2014	31.12.2013
A. Anlagevermögen		
I. Immaterielle Vermögensgegenstände	169.124	145.655
II. Sachanlagen		
Grundstücke & Bauten *)	72.362.776	72.362.775
Andere Anlagen	13.405.468	14.389.789
Geleistete Anzahlungen & Anlagen im Bau	148.752	83.815
Summe aus II.	85.916.996	86.840.379
III. Finanzanlagen		
Beteiligungen	330.000	155.625
Wertpapiere des Anlagevermögens zur Anlage des Stiftungsvermögens	291.654.216	292.148.269
Wertpapiere des Anlagevermögens zur Gebäudewiederbeschaffung	10.055.386	5.379.449
Summe aus III.	302.039.602	297.683.343
Summe für A.	388.125.722	384.669.377
B. Umlaufvermögen		
I. Vorräte	277.856	278.646
II. Forderungen und sonstige Vermögensgegenstände		
Forderungen aus Lieferungen und Leistungen	140.092	316.846
Forderungen gegen Unternehmen, mit denen ein Beteiligungsverhältnis besteht	233	6.240
Sonstige Vermögensgegenstände	1.399.999	1.376.329
Summe aus II.	1.540.324	1.699.415
III. Wertpapiere	9.000.000	11.500.000
IV. Kassenbestand, Bundesbankguthaben, Guthaben bei Kreditinstituten und Schecks	8.469.780	9.097.716
Summe für B.	19.287.960	22.575.777
C. Rechnungsabgrenzungsposten		
	200.951	224.957
Gesamtes Vermögen	407.614.633	407.470.111

*) § 253 Abs. 2 HGB wird nicht angewendet. Stattdessen werden Rücklagen gebildet.

Passiva	31.12.2014	31.12.2013
A. Eigenkapital		
I. Stiftungsvermögen		
Finanzierungskapital	286.323.453	286.323.453
Investitionskapital	97.145.457	97.145.457
Zustiftung Stadt Bonn	6.681.051	6.681.051
Zuführung Rücklagen	1.283.957	1.283.957
Summe aus I.	391.433.918	391.433.918
II. Rücklagen		
Freie Rücklage gemäß § 58 Nr. 7a AO	5.992.783	5.876.691
Instandhaltungsrücklage *)	4.443.788	3.943.789
Summe aus II.	10.436.571	9.820.480
III. Ergebnis		
Jahresüberschuss/-fehlbetrag	0	0
Summe aus III.	0	0
Summe für A.	401.870.489	401.254.398
B. Sonderposten aus Investitionszuschüssen	4.525.555	4.966.424
C. Rückstellungen	316.152	351.906
D. Verbindlichkeiten		
Verbindlichkeiten aus Lieferungen und Leistungen	627.177	720.998
Sonstige Verbindlichkeiten	273.976	166.850
Summe für D.	901.153	887.848
E. Rechnungsabgrenzungsposten	1.284	9.535
Gesamtes Vermögen	407.614.633	407.470.111

*) § 253 Abs. 2 HGB wird nicht angewendet. Stattdessen werden Rücklagen gebildet.

Organe der Stiftung

Stiftungsrat

Zum 31.12.2014 war der Stiftungsrat wie folgt zusammengesetzt:

Vorsitzender

Prof. Dr. Martin Stratmann

Präsident der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V.

Mitglieder

MinDir'in Bärbel Brumme-Bothe

Leiterin der Abteilung 6 im Bundesministerium für Bildung und Forschung

Prof. Dr. Jürgen Fohrmann

Rektor der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Staatssekretär Dr. Thomas Grünewald

Ministerium für Innovation, Wissenschaft und Forschung des Landes NRW

Prof. Dr. Bill Hansson

Vizepräsident der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V.,
Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie

Prof. Dr. Wieland B. Huttner

Max-Planck-Institut für molekulare Zellbiologie und Genetik

Prof. Dr. Regine Kahmann

Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie

Dr. Stefan Marcinowski

Vizepräsident der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V.

Jürgen Nimptsch

Oberbürgermeister der Bundesstadt Bonn

Prof. Dr. Wolfgang Plischke

Bayer AG

Tankred Schipanski

Mitglied des Deutschen Bundestages

Ulrich Schüller

Leiter der Abteilung 4 im Bundesministerium für Bildung und Forschung

Prof. Dr. Ferdi Schüth

Vizepräsident der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V.,
Max-Planck-Institut für Kohlenforschung

Karl Schultheis

Mitglied des Landtages NRW

Prof. Dr. Petra Schwille

Max-Planck-Institut für Biochemie

Prof. Dr. Heinz Wässle

Max-Planck-Institut für Hirnforschung

Vorstand

Zum 31.12.201 war der Vorstand wie folgt zusammengesetzt:

Prof. Dr. Ulrich Benjamin Kaupp

Geschäftsführender Direktor

Direktor der Abteilung „Molekulare Neurosensorik“

Dr. Jason Kerr

Direktor der Abteilung „Organisation des Gehirns und Verhaltens“

Gertrud Bilski

Kaufmännische Geschäftsführerin

caesarium

Caesar möchte mit dem *caesarium* zeigen, wie spannend und faszinierend Wissenschaft und Forschung sein können. Die Vorträge richten sich nicht (nur) an ein Fachpublikum, sondern gerade an interessierte Laien. Im Jahr 2014 fanden die folgenden *caesarien* statt:

Prof. Dr. Don Zagier

Max-Planck-Institut für Mathematik, Bonn

Collège de France, Paris

„Ramanujans Erbe: Von Zahlentheorie und schwarzen Löchern“

23.01.2014

caesarium
Forschungszentrum caesar, Hörsaal
Donnerstag, 23.01.2014, 19 h
„Ramanujans Erbe: Von Zahlentheorie und schwarzen Löchern“

Prof. Dr. Don Zagier
Max-Planck-Institut für Mathematik, Bonn
Collège de France, Paris

caesar
center of advanced
scientific studies
and research
www.caesar.de
Forschungszentrum caesar
Luthy-Strasse 2
53115 Bonn
Stiftung caesar -
mitglied der Max-Planck-Gesellschaft

Prof. Dr. Christof Koch

Allen Institute for Brain Science, Seattle, USA

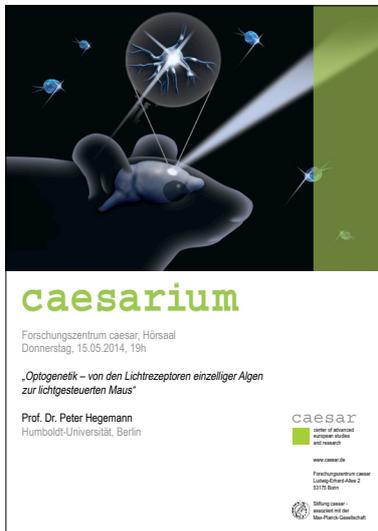
„Das Leib-Seele-Problem im 21. Jahrhundert - Die biologischen Grundlagen des Bewusstseins“

27.03.2014

caesarium
Forschungszentrum caesar, Hörsaal
Donnerstag, 27.03.2014, 19h
„Das Leib-Seele-Problem im 21. Jahrhundert
- Die biologischen Grundlagen des Bewusstseins“

Prof. Dr. Christof Koch
Allen Institute for Brain Science, Seattle, USA

caesar
center of advanced
scientific studies
and research
www.caesar.de
Forschungszentrum caesar
Luthy-Strasse 2
53115 Bonn
Stiftung caesar -
mitglied der Max-Planck-Gesellschaft

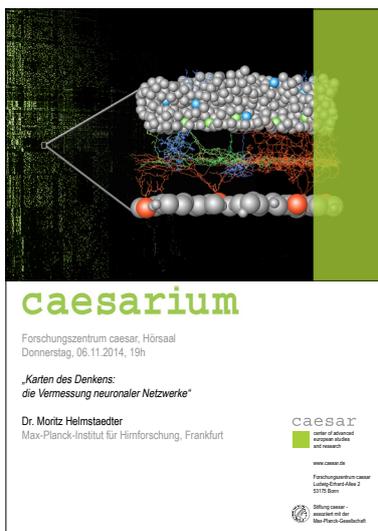


Prof. Dr. Peter Hegemann

Humboldt-Universität Berlin

„Optogenetik - Von den Lichtrezeptoren einzelliger Algen zur lichtgesteuerten Maus“

15.05.2014



Dr. Moritz Helmstaedter

Max-Planck-Institut für Hirnforschung, Frankfurt

„Karten des Denkens: die Vermessung neuronaler Netzwerke“

06.11.2014



Prof. Dr. Bill S. Hansson

Max-Planck-Institut für chemische Ökologie, Jena

„Sex, bugs & push'n'pull - Ein Exkurs in den Geruchssinn der Insekten“

18.12.2014





Impressum

Herausgeber

Stiftung caesar
Ludwig-Erhard-Allee 2
D- 53175 Bonn

Redaktion und Konzept

Prof. Dr. U. Benjamin Kaupp
Dr. Jürgen Reifarth
Stefan Hartmann

Textlayout

Stefan Hartmann

Cover

3D-Abbildung des caesar-Gebäudes

Druck

Brandt GmbH
Rathausgasse 13
53111 Bonn

© 2015

Stiftung caesar
Ludwig-Erhard-Allee 2
D-53175 Bonn
Tel.: +49 (0)228 9656-0
Fax: +49 (0)228 9656-111
E-Mail: office@caesar.de
<http://www.caesar.de>

