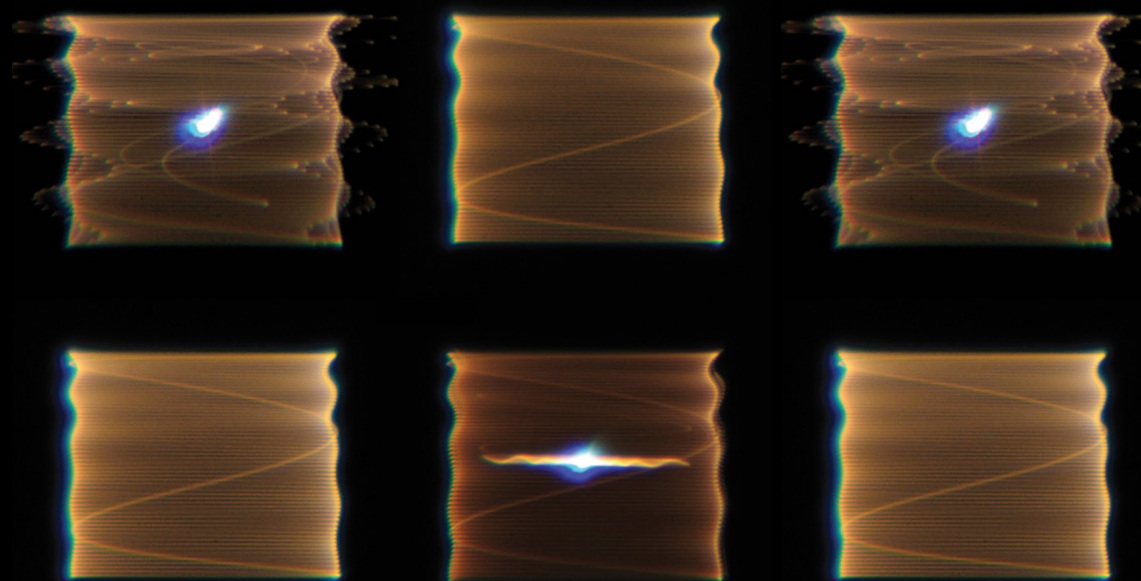




Annual Report 2015

Jahresbericht 2015

caesar



center of advanced
european studies
and research



Stiftung caesar -
assoziiert mit der
Max-Planck-Gesellschaft



Stiftung caesar -
assoziiert mit der
Max-Planck-Gesellschaft

caesar



center of advanced
european studies
and research

Annual Report 2015

Jahresbericht 2015



Table of contents | Inhaltsverzeichnis

Preface Vorwort	6
The International Max Planck Research School (IMPRS) for Brain and Behavior Die International Max Planck Research School (IMPRS) for Brain and Behavior <i>Denise Butler</i>	11
Research reports Forschungsberichte	15
Behavior and Brain Organization Organisation des Gehirns und Verhaltens <i>Jason Kerr</i>	16
Sperm are like grab bags – full of surprises Spermien sind wie Wundertüten – voller Überraschungen <i>U. Benjamin Kaupp und Stefan Hartmann</i>	38
Networks underlying the sense of direction Ein Netzwerk für den Orientierungssinn <i>Johannes Seelig</i>	48
Molecular Physiology – from molecule to function Molekulare Physiologie – vom Molekül zur Funktion <i>Dagmar Wachten</i>	56
Nano-scaffolds for membrane proteins – a made-to-measure environment for electron microscopy Nanogerüste für Membranproteine – eine maßgeschneiderte Umgebung für die Elektronenmikroskopie <i>Elmar Behrmann</i>	62
How are immune cells in the brain activated? Wie werden Immunzellen im Gehirn aktiviert? <i>Annett Halle</i>	68
How do populations of neurons in the visual system compute? – Making sense of complex neural and behavioural data Wie rechnen neuronale Populationen im Sehsystem? – Komplexe Datensätze sinnvoll interpretieren <i>Jakob Macke</i>	76



Celebrating an anniversary – 20 years of caesar Ein Jubiläum feiern – 20 Jahre caesar <i>Jürgen Reifarth und Stefan Hartmann</i>	82
Publications Publikationen	90
Figures and facts Zahlen und Fakten	94
Personnel Personal	95
Finances Finanzen	97
Foundation bodies Organe der Stiftung	100
caesarium	102



Preface

Over the past 100 years neuroscientists have gathered enormous amounts of information about the basic physiological properties that shape neuronal activity, but the most basic questions about how groups of neurons interact in a concerted manner to generate an animal's behavior remain unanswered. Why is this? The brain is extremely complicated, not only in what it can achieve, but also in its composition. Gaining a full understanding of how the brain works will require the coordinated combination of research at all scales of the neural system, ranging from single ion channels and their molecular makeup, to dense reconstruction of the neural circuits, to detailed and quantitative behavioral analysis. Currently a major challenge in neuroscience is how to integrate all the findings at these levels of scale so that behavior in an animal can be understood in terms of activity on the microscale: for it is how the animal makes use of the components that is ultimately important, not how the components operate in isolation. What makes this an especially difficult problem is that the link between brain function and behavior can only be studied in a behaving animal, and studying the brain in action poses huge technical challenges that need to be overcome before the most interesting questions, such as how does the brain maintain a dynamic model of the environment, and how the brain responds during complex social interactions, can be addressed. Although these questions have been posed for many decades, it is really only now that the technological advances required to address these and associated questions, are starting to become available.

Caesar's current focus is to observe, measure, quantify and understand the behavior of the unrestrained organism not only at a descriptive level but in terms of the neural processes that control

Vorwort

Im Laufe der letzten hundert Jahre haben Neurowissenschaftler außerordentlich viele Erkenntnisse über die physiologischen Mechanismen gewonnen, die neuronaler Aktivität zugrunde liegen. Dennoch bleiben die grundsätzlichen Fragen, wie Gruppen von Neuronen zusammenarbeiten, um das Verhalten eines Tieres zu steuern, unbeantwortet. Woran liegt das? Nicht nur in seiner Leistung, sondern auch in seinem Aufbau ist das Gehirn ein äußerst kompliziertes Organ. Um das Gehirn umfassend zu verstehen ist es daher notwendig, dass neurowissenschaftliche Forschung auf verschiedenen Ebenen eng miteinander verzahnt wird – beginnend bei einzelnen Ionenkanälen und ihrem molekularen Aufbau über die komplexe Rekonstruktion neuronaler Schaltkreise bis hin zu detaillierten und quantitativen Verhaltensanalysen. Eine der großen Herausforderungen in den Neurowissenschaften liegt derzeit darin, Erkenntnisse aus diesen unterschiedlichen Forschungsgebieten zusammenzuführen, so dass das Verhalten von Tieren anhand der Aktivität kleinster Einheiten nachvollzogen werden kann – letztendlich geht es darum zu verstehen, wie Tiere die unterschiedlichen Komponenten nutzen und nicht, wie die einzelnen Komponenten unabhängig voneinander agieren. Eine zusätzliche Schwierigkeit ergibt sich daraus, dass der Zusammenhang zwischen Gehirnfunktion und Verhalten nur am sich frei verhaltenden Tier erforscht werden kann; zur Untersuchung des aktiven Gehirns müssen deswegen zuerst enorme technische Herausforderungen bewältigt werden, bevor sich die Wissenschaftler den eigentlich interessanten Fragen widmen können: Wie repräsentiert das Gehirn ein dynamisches Modell seiner Umgebung? Was passiert im Gehirn während komplexer sozialer Beziehungen? Diese Fragen werden zwar seit Jahrzehnten gestellt, aber die erforderlichen technologischen Entwick-



behavior. For this we need to know how cellular properties result from the interplay of electrical and biochemical activation, how populations of cells coordinate their activity via a complex set of connections and how such coordinated activity then gives rise to cognition and to the planning and execution of behavior. Both current departments study the mechanisms that underlie behavior, albeit on different scales and using very different model systems: Professor Kaupp's department studies, for example, interactions of the ion channels allowing sperm to navigate, while Dr. Kerr's department studies the activity of cortical neuronal populations that underlies decision making. In both cases the organism needs to adapt its behavior to the environment by making decisions based on accurately sensing the environment.

Over the coming years the research at caesar will center on addressing one of the core questions of neurobiology: how do patterns of neuronal activity give rise to complex but coherent and goal-directed behavior? Achieving this goal of studying the relationship between neuronal activity and goal-directed behavior could encompass a broad range of research approaches, such as: building theoretical frameworks for quantification of complex data derived from neurons and behavior, developing tools for interrogation and reversible manipulation of neuronal circuits for understanding causal links between circuits and behavior, development of novel genetically encoded tools for circuit measurement, labeling, and manipulation, or investigating principles and neuronal mechanisms underlying choice economics, social behavior or complex predator prey interactions.

To this end, caesar is approaching a field of neuroscience research that offers many exciting new

lungen werden erst jetzt nach und nach einsetzbar. Die Forschung bei caesar konzentriert sich aktuell auf das Beobachten, Messen, Quantifizieren und Verstehen des Verhaltens frei agierender Organismen - nicht nur auf der beschreibenden Ebene, sondern mit Blick auf die das Verhalten steuernden neuronalen Prozesse. Dazu müssen wir verstehen, wie zelluläre Eigenschaften aus dem Zusammenspiel von elektrischer und biochemischer Aktivierung entstehen, wie Zellpopulationen ihre Aktivität anhand eines komplexen Verbindungsnetzes koordinieren und wie aus dieser koordinierten Aktivität letztendlich Kognition und Verhaltenssteuerung entsteht. Auf unterschiedlichen Ebenen und mit verschiedenen Modellsystemen beschäftigen sich beide wissenschaftlichen Abteilungen mit den Mechanismen, die Verhalten zugrunde liegen: Professor Kaupps Abteilung untersucht beispielsweise Interaktionen der Ionenkanäle, die die Navigation von Spermien ermöglichen. Die Abteilung von Dr. Kerr erforscht die Aktivität kortikaler Neuronenpopulationen, die Entscheidungsprozessen zugrunde liegt. In beiden Fällen muss der Organismus sein Verhalten an die Umgebung anpassen, indem er Entscheidungen trifft, die auf einer präzisen Erfassung seiner Umwelt basieren.

In den kommenden Jahren wird sich caesar einer der Kernfragen der Neurobiologie zuwenden: Wie bewirken Muster von neuronalen Aktivitäten komplexes, aber dennoch zielgerichtetes Verhalten? Zur Erforschung dieses Zusammenhangs steht ein breites Spektrum von Ansätzen zur Verfügung. Dazu gehören die Entwicklung theoretischer Methoden, um aus der Beobachtung von Neuronen und Verhalten gewonnene komplexe Daten quantifizieren zu können sowie die Entwicklung von Werkzeugen, die es ermöglichen, neuronale Schaltkreise zu untersuchen und zu beeinflussen, um die



scientific challenges that will undoubtedly lead to new basic discoveries through the development and application of new technologies. Given the current scientific expertise in caesar's departments and groups as well as its excellent scientific infrastructure, caesar is well positioned to take a leading role in defining this field.

This annual report gives an insight into the ongoing research and activities from the two Departments and five independent research groups currently here at caesar.

Kausalzusammenhänge zwischen diesen Schaltkreisen und dem Verhalten besser zu verstehen. Weitere Ansätze sind die Entwicklung innovativer genetisch kodierter Werkzeuge, um Schaltkreise vermessen, markieren und manipulieren zu können sowie die Untersuchung der Prinzipien und neuronalen Mechanismen ökonomischer Entscheidungen, sozialen Verhaltens oder komplexer Raubtier-Beute-Interaktionen.

Damit begibt sich caesar auf ein Gebiet der Neurowissenschaften, das neue spannende Forschungsaufgaben in großer Zahl bereit hält; durch Entwicklung und Anwendung innovativer Technologien werden hier zweifellos neue grundlegende Erkenntnisse gewonnen werden können. Mit der wissenschaftlichen Kompetenz seiner Abteilungen und Gruppen und seiner exzellenten Forschungsinfrastruktur ist caesar gut aufgestellt, bei der Entwicklung dieses Feldes eine führende Rolle zu übernehmen.

Dieser Jahresbericht gibt einen Einblick in die aktuelle Forschungsarbeit der derzeit zwei wissenschaftlichen Abteilungen und fünf unabhängigen Forschungsgruppen bei caesar.



A handwritten signature in black ink, consisting of a large 'S' followed by a horizontal line.

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



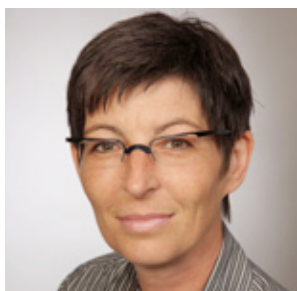
A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Jason Kerr'.

Dr. Jason Kerr
Geschäftsführender Direktor



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

Prof. Dr. U. Benjamin Kaupp
Direktor



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

Gertrud Bilski
Kaufmännische Geschäftsführerin



The International Max Planck Research School (IMPRS) for Brain and Behavior

Denise Butler | Coordinator, IMPRS for Brain and Behavior

The International Max Planck Research School (IMPRS) program was established in 2000 by the Max Planck Society to provide talented junior scientists the opportunity to earn a doctorate under excellent research conditions. The 3-year structured doctoral program has grown to currently 60 schools including the IMPRS for Brain and Behavior which was approved in December 2014.

Die International Max Planck Research School (IMPRS) for Brain and Behavior

Die International Max Planck Research Schools (IMPRS) gehören seit 2000 zum festen Bestandteil der Doktorandenförderung der Max-Planck-Gesellschaft. Begabte Nachwuchswissenschaftler erhalten die Chance, unter exzellenten Bedingungen zu promovieren. Mittlerweile umfasst das dreijährige strukturierte Doktorandenprogramm 60 Schulen, darunter die IMPRS for Brain and Behavior,

Although there are 60 IMPRS, for the first time an IMPRS unites Max Planck Institutes and their university partners on both sides of the Atlantic. The graduate school is run in cooperation with caesar's partners in the USA (Max Planck Florida Institute of Neuroscience and Florida Atlantic University) and the University of Bonn with the IMPRS Coordination Office located at caesar.

In 2015, the IMPRS for Brain and Behavior mastered the unique challenges associated with the transatlantic structure of the school and had a successful initial year. In May a coordinator, Denise Butler, was hired and Speaker Jason Kerr called the first Steering Committee meeting at caesar with representatives from all partner institutions present. By July the website (www.IMPRS-Brain-Behavior.mpg.de) was live and an online application software was in development. The application round ran from September 1 to December 1, with a stellar first year response of 230 applications. Through a two-tier on-line evaluation and rating system, the Selection Committee reduced the applicant pool to 25 invitees who attended a Selection Workshop held in Bonn on March 14 – 15, 2016. After extensive interviews and discussions, 17 of the candidates were offered admission to IMPRS of which 15 accepted a position in the graduate school – 5 in Florida, 10 in Bonn. The 3 merit-based IMPRS Fellowships were awarded to two students going to the University of Bonn labs and one joining caesar.

The IMPRS goal is to provide an exceptional framework and support system for the students exposing them to an extraordinarily broad group of international scientists at the partner institutions. Introducing students to a scientific culture of collaborative interaction and cooperation is a major focus of this IMPRS. In keeping with this focus, the exchange activity organized with the Bonn International Graduate School – Neuroscience and the IMPRS applicants during the Selection Workshop was a huge success.

Throughout 2015 the IMPRS Teaching Committee has been active in developing an outstanding

die im Dezember 2014 bewilligt wurde.

Trotz der großen Anzahl an Schulen werden in der IMPRS for Brain and Behavior zum ersten Mal überhaupt Max-Planck-Institute und ihre universitären Partner auf beiden Seiten des Atlantiks zusammengeführt. Caesar leitet die Graduiertenschule in Kooperation mit seinen Partner in den USA (Max Planck Florida Institute of Neuroscience und die Florida Atlantic University) und der Universität Bonn. Die Koordination übernimmt caesar.

2015 bedeutete für die IMPRS for Brain and Behavior ein erfolgreiches erstes Jahr. Alle Herausforderungen, die sich aus der transatlantischen Struktur ergaben, konnten bewältigt werden. Im Mai wurde mit Denise Butler eine Koordinatorin eingestellt und der Sprecher der Schule, Jason Kerr, organisierte das erste Treffen des Lenkungsausschusses, bestehend aus Vertretern aller Partnerinstitute. Im Juli ging die Website (www.IMPRS-Brain-Behavior.mpg.de) live und es wurde eine Online-Bewerbungsplattform entwickelt. Die erste Runde des Bewerbungsverfahrens lief vom 1. September bis zum 1. Dezember mit einer herausragenden Resonanz von 230 Bewerbungen. Mittels eines zweistufigen Online-Evaluations- und Bewertungssystems konnte der Lenkungsausschuss den Bewerberpool deutlich reduzieren. 25 Bewerberinnen und Bewerber wurden zu einem Auswahlworkshop eingeladen, der am 14. und 15. März in Bonn stattfand. Nach ausführlichen Interviews und Diskussionen wurden 17 Kandidatinnen und Kandidaten die Aufnahme in die IMPRS angeboten. 15 davon nahmen das Angebot an - darunter 5 in Florida und 10 in Bonn. Drei leistungsabhängige Stipendien wurden an zwei Doktoranden vergeben, die zukünftig in Laboren der Universität Bonn arbeiten werden, und an einen Doktoranden, der bei caesar anfangen wird zu forschen.

Die IMPRS möchte den Doktoranden einen außergewöhnlichen Rahmen bieten. Eine außergewöhnlich hohe Anzahl an internationalen Wissenschaftlern in den Partnerinstituten unterstützt die Doktoranden während ihrer Ausbildung. Ein wichtiges Ziel der IMPRS ist es, den Doktoranden



Together with the Bonn International Graduate School of Neuroscience (BIGS), the IMPRS for Brain and Behavior applicants had a tour through Bonn with good conversations.

Gemeinsam mit der Bonn International Graduate School of Neuroscience (BIGS) machten die Bewerber/innen der IMPRS for Brain and Behavior eine Tour durch Bonn und tauschten sich aus.

curriculum for both Florida and Bonn comprised of theoretical and hands-on training in advanced neuroscience techniques. Looking forward, the IMPRS is set to launch its structured academic program with a 2-week Summer School at caesar on August 29, 2016. The workshop will combine lectures and hands-on lab experience in the latest techniques in electrophysiology, microscopy, and optics. A distinguished group of internationally renowned neuroscientists have already confirmed participation.

die wissenschaftliche Kultur der Zusammenarbeit und Kooperation näher zu bringen. In Übereinstimmung mit diesem Ziel können vor allem die gemeinsamen Aktivitäten mit der Bonn International Graduate School of Neuroscience (BIGS) während des Auswahlworkshops als großer Erfolg gewertet werden.

Während des letzten Jahres hat die Ausbildungskommission der IMPRS ein herausragendes Curriculum entwickelt, das sowohl den Erwerb theoretischer Kenntnisse als auch praktisches Training in modernsten neurowissenschaftlichen Techniken umfasst. Ein erster Höhepunkt wird eine zweiwöchige Summer School sein, die am 29. August bei caesar beginnt. In diesem Workshop wechseln Vorträge und praktische Übungen im Labor ab, mit dem Ziel, die neuesten elektrophysiologischen, mikroskopischen und optischen Techniken zu vermitteln. Einige international anerkannte Neurowissenschaftler haben ihre Teilnahme bereits fest zugesagt.



IMPRS applicants during the Selection Workshop held in Bonn at caesar.

IMPRS-Bewerberinnen während des bei caesar abgehaltenen Auswahlworkshops.

Research reports Forschungsberichte

Contact

Jason N. D. Kerr

Research Center caesar

Department of

Behavior and Brain Organization

Phone: +49 (0)228 9656-103

jason.kerr@caesar.de



Behavior and Brain Organization

Organisation des Gehirns und Verhaltens

Jason N. D. Kerr | Department of Behavior and Brain Organization

The primary aim of the department Behavior and Brain Organization (BBO) is to understand how mammals use vision to make decisions and what the underlying neural processes are. To achieve this aim, research at BBO combines imaging, computation, behavioral analysis, electrophysiological recordings, and anatomical

Das zentrale Anliegen der Abteilung Organisation des Gehirns und Verhaltens („Behavior and Brain Organization“, BBO) ist es zu verstehen, wie Säugtiere anhand ihres Sehvermögens Entscheidungen treffen, und die Grundprinzipien der daran beteiligten neuronalen Schaltkreise zu erforschen. Dazu werden Bildgebung, computer-

mapping to explore the connection between behavior and neuronal activity. The research of BBO can be divided into two broad regions. The first develops tools and techniques for recording and analyzing neuronal activity, with single-cell and single action-potential resolution, from large populations of cortical neurons in awake and freely moving mammals. The second is focused on understanding the neuronal mechanisms underlying vision-based decision making in freely moving mammals. This involves the development of special multiphoton microscopes and of optics-based head and eye-tracking techniques that can be used on freely behaving animals from a range of mammalian species.

Presented here are updates on some of the research undertaken by the department since the previous report. One major focus of the department's research has been to increase the depth at which we can accurately record from cortical neuronal populations labelled with a genetically encoded activity indicator. In the first project **"Imaging activity from neuronal populations in the freely moving rodent"**, the aim was to increase the imaging depth of our custom-designed miniaturized head-mounted multiphoton microscope to allow imaging in deeper cortical layers in the freely moving animal. In the second project **"Three-photon imaging of neuronal activity in deep cortical layers"**, the aim was to use the three-photon excitation principle to image from neurons in all depths of a rat cortical column. The final article **"Accurate inference of neuronal spiking *in vivo* using quantitative biophysical-based models of calcium sensor proteins"** describes results from a project that aims to develop a flexible, biophysically-based algorithm for modelling fluorescence changes in Ca^{2+} -indicators *in vivo* for the purposes of accurate inference of action-potential firing times from our population imaging data. Together, these project reports provide an overview of some of the major research undertaken in the past 12 months.

basierte Algorithmen, Verhaltensanalyse und Anatomie kombiniert, um Zusammenhänge zwischen Verhalten und neuronaler Aktivität erkennen zu können. Die Forschung der Abteilung BBO lässt sich in zwei grundsätzliche Bereiche unterteilen: Zum einen entwickeln die Wissenschaftler Werkzeuge und Verfahren zur Erfassung und Analyse neuronaler Aktivität von Populationen kortikaler Nervenzellen in wachen und sich frei bewegenden Tieren mit einer Auflösung bis hinunter zu einzelnen Zellen und Auflösung einzelner Aktionspotentiale. Zum anderen beschäftigen sie sich mit den neuronalen Prozessen, die der Entscheidungsfindung aufgrund optischer Reize in einem sich frei bewegenden Tier zugrunde liegen. Das erfordert die Entwicklung spezieller Multiphotonenmikroskope sowie optischer Verfahren zur Detektion von Kopf- und Augenbewegungen, die an sich frei bewegenden Tieren verschiedener Säugetiergattungen angewandt werden können.

Im Folgenden soll anhand ausgewählter Projekte ein Einblick in die Forschungsarbeit der Abteilung seit dem letzten Bericht gegeben werden. Während des letzten Jahres lag einer der Forschungsschwerpunkte auf der Verbesserung der Eindringtiefe, in der Signale von Populationen kortikaler Neuronen, die mithilfe genetischer Aktivitätsindikatoren markiert wurden, gemessen werden können. Im ersten vorgestellten Projekt **„Bildgebung von Nervenaktivität in neuronalen Populationen im sich frei bewegenden Nagetier“** war das Ziel, die Tiefe der Bildgebung des selbstentwickelten kopfgetragenen Miniatur-Multiphotonenmikroskops so zu erhöhen, dass Bildgebung in tieferen kortikalen Schichten in einem sich frei bewegenden Tier möglich wird. Im zweiten Projekt, **„Dreiphotonenbildgebung neuronaler Aktivität in tiefen kortikalen Lamina“**, war das Ziel, das Prinzip der Dreiphotonenanregung zu nutzen, um alle Schichten der kortikalen Säule in einer Ratte abbilden zu können. Im letzten Artikel werden die Ergebnisse des Projekts **„Präzise Inferenz neuronaler Aktionspotentiale**



(*in vivo*) mithilfe quantitativer biophysikalischer Modelle proteinbasierter Kalziumsensoren“ beschrieben. Das Ziel ist, flexible, biophysikalisch basierte Algorithmen zu entwickeln, die es erlauben, Fluoreszenzänderungen von Ca^{2+} -Aktivitätsindikatoren (*in vivo*) zu modellieren. Hierdurch soll ermöglicht werden, präzise das zeitliche Auftreten von Aktionspotentialen aus unseren vorhandenen Bildgebungsdaten zu inferieren. Gemeinsam stellen diese Projektberichte einen Überblick über einen Teil unserer Forschungsbereiche der letzten 12 Monate dar.



Imaging activity from neuronal populations in the freely moving rodent

Stefanie Rulla, Patrick Rose, Juergen Sawinski, Damian J. Wallace & Jason N. D. Kerr

Department of Behavior and Brain Organization

Imaging technologies developed over the past 20-30 years have revolutionized how neurons can be interrogated *in vivo*. Foremost amongst these new technologies is multiphoton microscopy [1], a form of fluorescence microscopy which has provided the first microscopic visualization of neurons and their sub-structures in the intact, living brain. In combination with genetically-encoded activity indicators [2-4] and optogenetic tools for manipulating neuronal activity [5, 6], these technologies now allow simultaneous quantification and manipulation of neuronal activity in awake animals. However, in order to understand the computations occurring in the brain it is essential now not only to visualize populations of neurons and quantify and manipulate their activity, but also to be able to investigate this activity in the context of self-determined behavior. As one of the key functions of the brain is to accumulate and process information from the surrounding environment and generate an appropriate behavioral response, measuring the activity of the brain in the absence of behavior is observing only a small fraction of the brain's function.

The capacity to take advantage of these new imaging and molecular technologies during behavior requires either that the animal is head-fixed under the microscope, or that the microscope is miniaturized to the point where it can be readily carried by the animal without unduly disturbing the behavior. In collaboration with Winfried Denk in Heidelberg, we recently developed a fully functional, miniaturized multiphoton microscope [7] small enough to be carried by freely behaving rats (Figure 1a). While this microscope provided the first images of the activity of cortical neurons in a freely moving animal, its key limitation was the uncompensated distortion of the excitation light

Bildgebung von Nervenaktivität in neuronalen Populationen im sich frei bewegenden Nagetier

In den zurückliegenden zwanzig bis dreißig Jahren wurden verschiedene Bildgebungsverfahren entwickelt, die die Möglichkeiten revolutioniert haben, Neuronen *in vivo* zu betrachten. Unter diesen neuen Technologien ist die Multiphotonenmikroskopie [1], eine spezielle Form der Fluoreszenzmikroskopie, die erste, die eine mikroskopische Aufnahme von Neuronen und ihren Substrukturen im intakten Gehirn ermöglicht hat. Zusammen mit genetisch kodierten Aktivitätsindikatoren [2-4] und optogenetischen Methoden zur Beeinflussung von neuronaler Aktivität [5, 6] erlauben diese Techniken heute die gleichzeitige quantitative Untersuchung und Manipulation von Nervenaktivität in wachen Tieren. Um die Vorgänge im Gehirn wirklich zu verstehen reicht es jedoch nicht aus, lediglich neuronale Populationen zu betrachten und deren Aktivität zu beeinflussen. Es ist darüber hinaus auch zwingend notwendig, diese Aktivität im Kontext von selbstbestimmtem Verhalten zu analysieren. Eine der Schlüsselfunktionen des Gehirns ist ja, Informationen aus der Umgebung aufzunehmen und daraus eine geeignete Verhaltensantwort zu generieren. Einzig die Aktivität des Gehirns zu messen, ohne das Verhalten eines Tieres zu berücksichtigen, bedeutet daher, einen wichtigen Teil der Hirnfunktion außer Acht zu lassen.

Um das große Potenzial der neuen Mikroskopie- und Molekulartechnologien auch während der Durchführung von Verhaltensexperimenten nutzen zu können, ist es entweder notwendig, dass das Tier unter dem Mikroskop am Kopf fixiert wird oder dass das Mikroskop so verkleinert wird, dass es – ohne das Verhalten entscheidend zu beeinflussen – vom Tier selbst getragen werden kann. In Zusammenarbeit mit Winfried Denk, Heidelberg, konnten wir ein voll funktionsfähiges

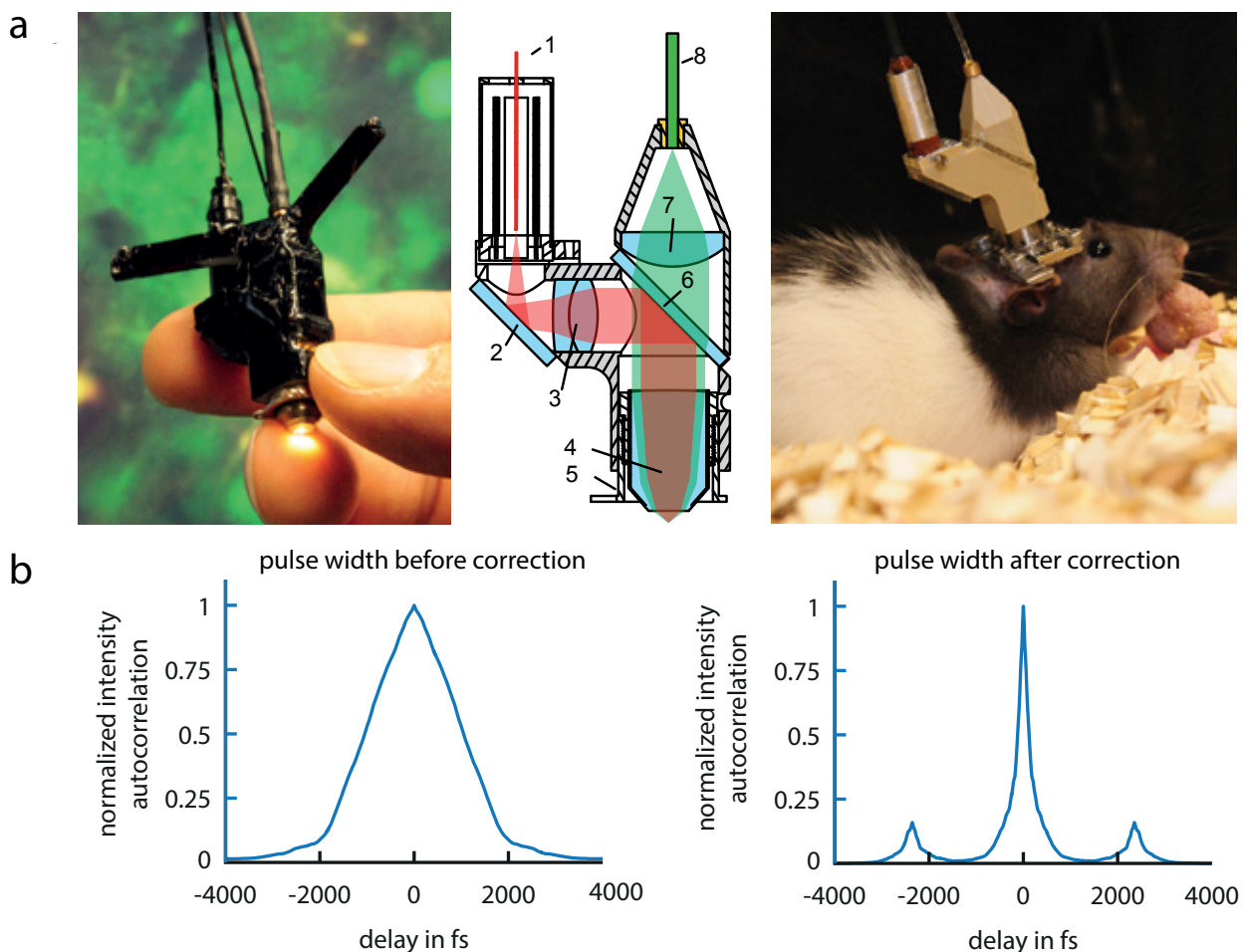


Figure 1. The miniaturized multiphoton microscope. **a.** Photograph of the miniaturized multiphoton microscope (left), schematic of the microscope design (middle) and microscope in place on the head of a rat (right). Elements in the schematic design: 1, excitation fiber; 2, folding mirror; 3, tube lens; 4, objective; 5, focusing flange; 6, beam splitter; 7, collimation lens; 8, collection fiber. **b.** Autocorrelograms of pulse width after the optical fiber for the original microscope (left) and after incorporation of the new optical compensation system (right).

Abbildung 1. Das Miniatur-Multiphotonenmikroskop. **a.** Foto des Miniatur-Multiphotonenmikroskops (links), Schema des Mikroskopdesigns (Mitte) und Mikroskop auf dem Kopf einer Ratte (rechts). Komponenten der Schemazeichnung: 1. Faser zur Anregung, 2. Umlenkspiegel, 3. Tubuslinse, 4. Objektiv, 5. Fokusring, 6. Strahlteiler, 7. Kollimationslinse, 8. Sammelfaser. **b.** Autokorrelogramme der Pulsbreiten nach der optischen Faser für das ursprüngliche Mikroskop (links) sowie nach Einbau des neuen optischen Kompensationssystems (rechts).

source (laser pulses) introduced by the optical fiber used to deliver the laser light source to the cortex. These distortions dramatically limited the depth from the brain surface in which neurons could be visualized, $\sim 200 \mu\text{m}$. In addition, while bright fluorescent structures could be visualized, dimmer structures were substantially harder to detect. This severely limited the use of the miniature microscope when neurons were labelled with the latest genetically-encoded indicators, which are very dim when at rest [3].

Miniatur-Multiphotonenmikroskop entwickeln [7], das klein genug ist, um von einer frei laufenden Ratte getragen zu werden (Abbildung 1a). Dieses Mikroskop war zwar in der Lage, erfolgreich die ersten Aufnahmen von kortikaler Nervenaktivität in einem frei laufenden Tier zu machen, es wurde jedoch durch unkompensierte Verzerrungen des Anregungslichts (Laserpulse) limitiert. Diese Verzerrungen entstehen innerhalb der optischen Faser, die zur Übertragung der Pulse von der Laserlichtquelle hin zur Hirnoberfläche verwendet wird. Die Tiefe unterhalb der Hirnoberfläche, in

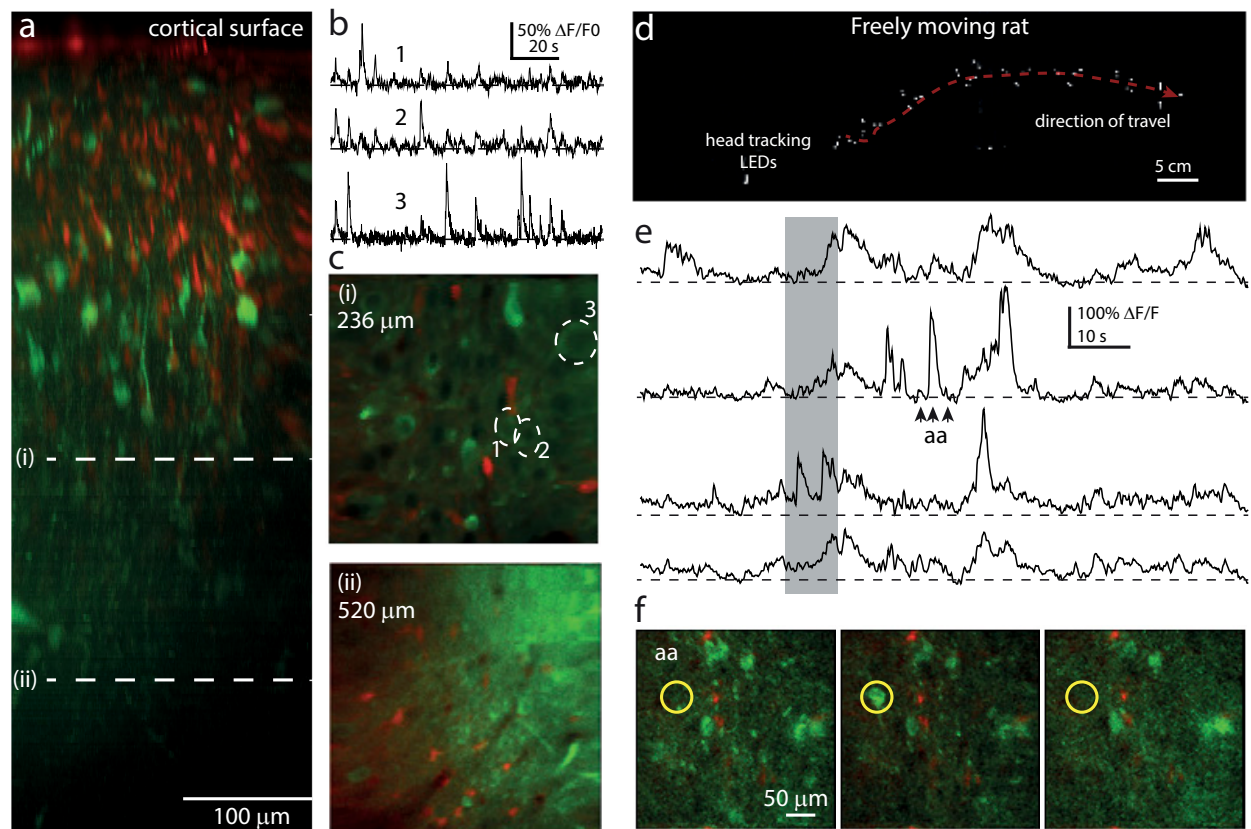


Figure 2. Increased depth of imaging. **a.** Side-projection from a z-stack taken using the miniaturized multiphoton microscope after incorporation of the new optical compensation system. **b.** Example calcium transient traces acquired with the miniaturized microscope in an anesthetized rat. Traces labelled 1, 2 and 3 show Ca^{2+} -fluorescence time series data from the neurons labelled accordingly in **c** (i). **c.** Individual image planes from the depths indicated in the side projection. **d.** Strobe-style composite of 8 individual images from an overhead tracking camera showing the movement of the animal during the section highlighted with the grey box in the Ca^{2+} -transient traces shown in **e**. **e.** Ca^{2+} -transient traces acquired from a freely moving rat. Data from the same animal as the data in **a**. Arrows labelled aa in the second trace indicate the time points of the three images in the image series labelled in **f**. **f.** Example images highlighting a fluorescent transient in a single neuron. The neuron from which the second trace in **e** was acquired is indicated by the yellow circles.

Abbildung 2. Verbesserung der Abbildungstiefe. **a.** Seitenansicht einer schichtweisen Aufnahme in die Tiefe, die durch das Miniatur-Multiphotonenmikroskop mit neuem optischen Kompensationssystem realisiert wurde. **b.** Beispiel für Kalziumtransienten, die mit dem Miniaturmikroskop in anästhesierten Ratten aufgenommen wurden. Die Linien 1, 2 und 3 zeigen den zeitlichen Ca^{2+} -Fluoreszenzverlauf der entsprechenden Neuronen in **c** (i). **c.** Einzelne Schichtaufnahmen aus verschiedenen Tiefen in **a**. **d.** Überlagerung 8 einzelner Aufnahmen, die mit den Kameras über der Versuchsarena aufgenommen wurden, die die Bewegung des Tieres während der in **e** grau markierten Kalziumtransienten aufzeigen. **e.** Kalziumtransienten, die im sich frei bewegendem Tier aufgenommen wurden. Es handelt sich um dasselbe Tier wie in **a**. Die beschrifteten Pfeile des zweiten Transienten entsprechen den Zeitpunkten der Abbildungen in **f**. **f.** Beispielaufnahmen, welche die Fluoreszenztransienten in einem einzelnen Neuron hervorheben. Das Neuron, aus dem der zweite Zeitverlauf in **e** aufgenommen wurde, ist mit gelben Kreisen dargestellt.

We describe here some recent results from a project undertaken to improve the efficiency of transmission of the excitation pulses through the optical fiber of the miniaturized microscope. The design introduced into the beam path a new, custom-designed and built optical compensation system developed by modelling the expected pulse distortions.

The major distortion introduced by the optical fiber is a dramatic prolongation of the duration of the laser

der Neuronen erfolgreich abgebildet werden konnten, wurde dadurch auf $\sim 200 \mu\text{m}$ beschränkt. Zusätzlich waren hell fluoreszierende Strukturen oft gut zu sehen, während dunklere Bereiche deutlich schwieriger darzustellen waren. Bei der Verwendung von modernen, genetisch kodierten Indikatoren zur Anfärbung von Neuronen schränkte dies den Nutzen des Miniaturmikroskops erheblich ein, da diese Sensoren gerade im Ruhezustand sehr wenig Fluoreszenz aufweisen [3].

pulses. In the original version of the miniaturized microscope, the laser pulses were prolonged from approximately 110 femtoseconds as generated by the laser source to ~3000 femtoseconds after the optical fiber and microscope objective (Figure 1b). The new optical compensation system reduced the pulse prolongation to ~300 femtoseconds. The reduced pulse width, and consequent increase in excitation efficiency, dramatically increased the depth at which fluorescent structures were visible (Figure 2a). The previous version was limited in depth to the superficial part of layer 2/3, to a depth of about 200 μm below the brain surface. Using the new compensation system, structures were still clearly visible to a depth of well over 500 μm from the brain surface, with Ca^{2+} -transients readily detectable in the visualized structures (Figure 2). As the design of the microscope itself was not altered compared to the original version, animals could easily carry the instrument while freely moving, displayed normal behaviors and performed a gap-crossing task (Figure 2). This miniaturized microscope now allows quantification of neuronal activity in populations of neurons at numerous cortical depths in freely behaving animals.

Wir berichten hier über einige aktuelle Ergebnisse aus unserem Projekt zur Verbesserung der Übertragungseffizienz von Anregungslaserpulsen durch die optische Faser des Miniaturmikroskops. Dazu wurden die erwarteten Pulsverzerrungen durch die Faser zunächst modelliert und anschließend ein entsprechend selbstgebautes und maßgeschneidertes optisches Kompensationssystem in den Strahlengang eingebracht.

In der Hauptsache verursacht die optische Faser eine drastische Verlängerung der Laserpulsdauer. In der ursprünglichen Version des Miniaturmikroskops wurden die Laserpulse von etwa 110 Femtosekunden Dauer direkt nach dem Laser auf ~3000 Femtosekunden nach der optischen Faser und dem Mikroskopobjektiv verlängert (Abbildung 1b). Das neue Kompensationssystem reduziert die Pulsverlängerung auf ~300 Femtosekunden. Diese verringerte Pulsbreite und die damit verbesserte Anregungseffizienz erhöhen die Tiefe, in der fluoreszierende Strukturen sichtbar sind, signifikant (Abbildung 2a). Die vorhergehende Version des Mikroskops war auf die oberflächlichen Bereiche von Lamina 2/3 und damit auf eine Tiefe von rund 200 μm unterhalb der Hirnoberfläche beschränkt. Durch die Verwendung des neuen Kompensationssystems können nun Strukturen weit über eine Tiefe von 500 μm unterhalb der Hirnoberfläche hinaus klar aufgelöst sowie Ca^{2+} -Transienten innerhalb dieser Strukturen leicht detektiert werden (Abbildung 2). Da das Design des Mikroskops selbst im Vergleich zur ursprünglichen Version nicht verändert wurde, können die Tiere das Messinstrument weiterhin problemlos tragen, während sie sich frei bewegen. Im Experiment zeigen sie so normales Verhalten und führen eine Distanz-Sprung-Übung aus (Abbildung 2). Dieses Miniaturmikroskop erlaubt damit die Quantifizierung von Nervenaktivität in neuronalen Populationen in unterschiedlicher kortikaler Tiefe in sich frei verhaltenden Tieren.



Three-photon imaging of neuronal activity in deep cortical layers

Alexandr Klioutchnikov, Takashi Handa, Damian J. Wallace & Jason N. D. Kerr

Department of Behavior and Brain Organization

Multiphoton imaging is an efficient way to assess neuronal activity *in vivo*. This unique technique is a form of fluorescence microscopy that relies on non-linear excitation principles, and when combined with labelling of neuronal populations with fluorescent activity-dependent Ca^{2+} -indicators, allows monitoring neuronal activity in the intact brain and in freely moving animals [8, 9]. However, reliable quantification of neuronal activity using this technique has been limited to the upper cortical layers, largely because scattering of delivered excitation light results in decreasing intensity at deeper focal points, which decreases the signal level exponentially with depth. This makes labelled structures appear dim, with strong averaging of numerous individual images required to accurately visualize the neurons of interest. The reduction in temporal resolution resulting from this requirement to average prevents reliable activity detection from labelled neurons.

It is possible to compensate the signal level decrease with a commensurate increase in excitation laser intensity. However, due to the exponential nature of the required increase of intensity with depth, the average laser power outside of the focal point rises with depth and eventually reaches an intensity sufficient to elicit multiphoton excitation near the brain surface (Figure 1). This “out-of-focus” fluorescence results in a severe drop in signal to background ratio (SBR), which is the cause of the fundamental depth limit of two-photon excitation [10, 11]. We have recently approached this limit *in vivo* by using the regenerative amplifier multiphoton microscopy (RAMM; [12]).

An efficient method to reduce SBR drop with depth is to increase the excitation wavelength, as scattering of light in the tissue decreases

Dreiphotonenbildgebung neuronaler Aktivität in tiefen kortikalen Lamina

Multiphotonenmikroskopie ist eine effiziente Möglichkeit, neuronale Aktivität *in vivo* zu beobachten. Diese einzigartige Technik ist eine Variante der Fluoreszenzmikroskopie, die sich die Prinzipien der nichtlinearen Anregung zu Nutze macht. Durch Markierung von neuronalen Populationen mit aktivitätsabhängigen, fluoreszenten Ca^{2+} -Indikatoren wird die Beobachtung neuronaler Aktivität in intakten Gehirnen sich frei bewegender Tiere ermöglicht [8, 9]. Eine verlässliche Quantifizierung der neuronalen Aktivität mittels dieser Technik ist jedoch hauptsächlich auf Grund von Streuung des anregenden Lichts auf die oberen kortikalen Schichten begrenzt. Dies führt aufgrund des exponentiellen Abfalls des Signals mit zunehmender Eindringtiefe zu einer reduzierten Lichtintensität an tieferliegenden Fokuspunkten. Markierte Strukturen erscheinen dadurch lediglich schemenhaft, so dass eine Vielzahl von Einzelbildern gemittelt werden muss, um das zu untersuchende Neuron zu visualisieren. Die daraus resultierende Reduzierung der zeitlichen Auflösung verhindert eine verlässliche Detektion der Aktivität eines markierten Neurons.

Es ist jedoch möglich, den Signalabfall mit einer entsprechenden Erhöhung der anregenden Laserintensität zu kompensieren. Durch die exponentielle Abhängigkeit der benötigten Intensität von der Eindringtiefe wird jedoch schnell ein Schwellenwert erreicht, an dem Multiphotonenanregung bereits fokusfern in oberflächlichen Schichten des Gehirn stattfindet (Abbildung 1). Diese fokusferne Fluoreszenz resultiert in einem signifikanten Abfall des Signal-Hintergrund-Verhältnisses (SBR, “signal to background ratio”), der die fundamentale Tiefenbegrenzung der Zweiphotonenanregung begründet [10, 11]. Wir sind dieser Grenze *in vivo* bereits mittels regenerativ verstärkter Multiphotonen-

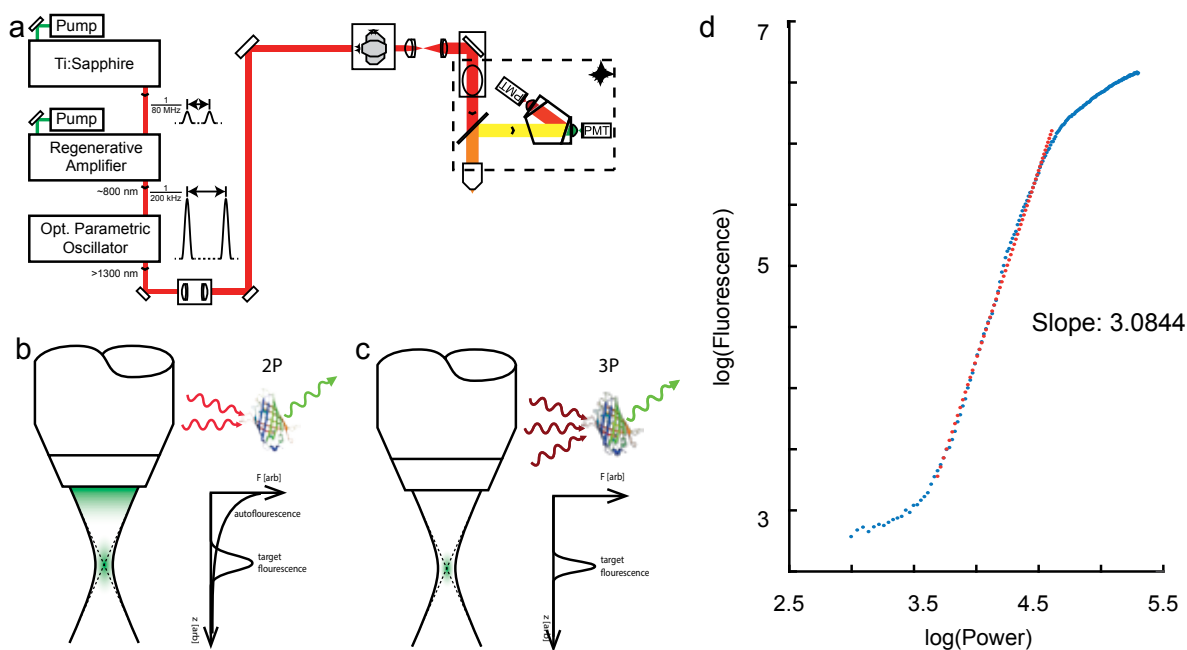


Figure 1. Principle of three-photon excitation and laser setup. **a.** Laser setup used for providing three-photon excitation. The Mira900 ultrafast Ti:Sapphire laser generates pulses at 800 nm used for seeding the Regenerative Amplifier (RegA9000). The optical parametric amplifier (OPA) is then used to tune the wavelength of the resulting pulses in the 1100-2400 nm wavelength range. **b and c.** Fluorophores can be excited by one-, two- (b), three- (c) or more photon excitation mechanisms. **d.** Third order characteristic of excitation of fluorescein in solution at 1300 nm has been measured in our setup.

Abbildung 1. Prinzip der Dreiphotonenabsorption und Laseraufbau. **a.** Laseraufbau für die Dreiphotonen-Anregung. Der ultraschnelle Ti:Saphir-Laser (Mira900) erzeugt Pulse um 800 nm, mit denen ein regenerativer Verstärker (RegA9000) angeregt wird. Der optisch parametrische Verstärker (OPA) erzeugt daraus durchstimbare Pulse mit Wellenlängen in einem Bereich von 1100 bis 2400 nm. **b, c.** Fluorophore können sowohl durch ein, zwei (b), drei (c) oder mehrere Photonen angeregt werden. **d.** Die Anregungscharakteristik der dritten Ordnung einer Fluorescein-Lösung wurde bei 1300 nm in unserer Versuchsanordnung gemessen.

with increasing wavelength. However, simply increasing excitation wavelength is complicated by the fact that fluorescent activity indicators have limited excitation spectra for two-photon absorption, and that indicators maximally excited by longer wavelengths are not yet sensitive enough to provide reliable quantification of neuronal activity. It is, however, also possible to excite conventional activity indicators with significantly longer excitation wavelengths using a higher order non-linear interaction called three-photon absorption (Figure 1). Commonly used green calcium indicators, such as GCaMP6s, reach maximal efficiency when using a pulsed excitation laser source centered at around 920 nm for two-photon absorption. In contrast, excitation by three-photon absorption is highly efficient at about 1300 nm (Figure 1). This significantly reduces

mikroskopie (RAMM, “regenerative amplifier multiphoton microscopy”, [12]) nahe gekommen.

Eine effiziente Methode, um den SBR-Abfall mit der Eindringtiefe zu reduzieren, besteht in der Erhöhung der Anregungswellenlänge, da die Lichtstreuung im Gewebe mit steigender Wellenlänge abnimmt. Die einfache Erhöhung der Anregungswellenlänge wird jedoch durch das begrenzte Anregungsspektrum für Zweiphotonenabsorption der aktivitätsabhängigen Fluoreszenzindikatoren erschwert. Ferner sind aktuelle Indikatoren mit einem Anregungsmaximum bei größeren Wellenlängen derzeit nicht ausreichend empfindlich, um eine verlässliche Quantifizierung neuronaler Aktivität zu gewährleisten. Es ist jedoch möglich, mittels nicht-linearer Wechselwirkung höherer Ordnung, der Dreiphotonenabsorption, konventionelle Aktivitätsindikatoren mit signifikant größeren Wellen-

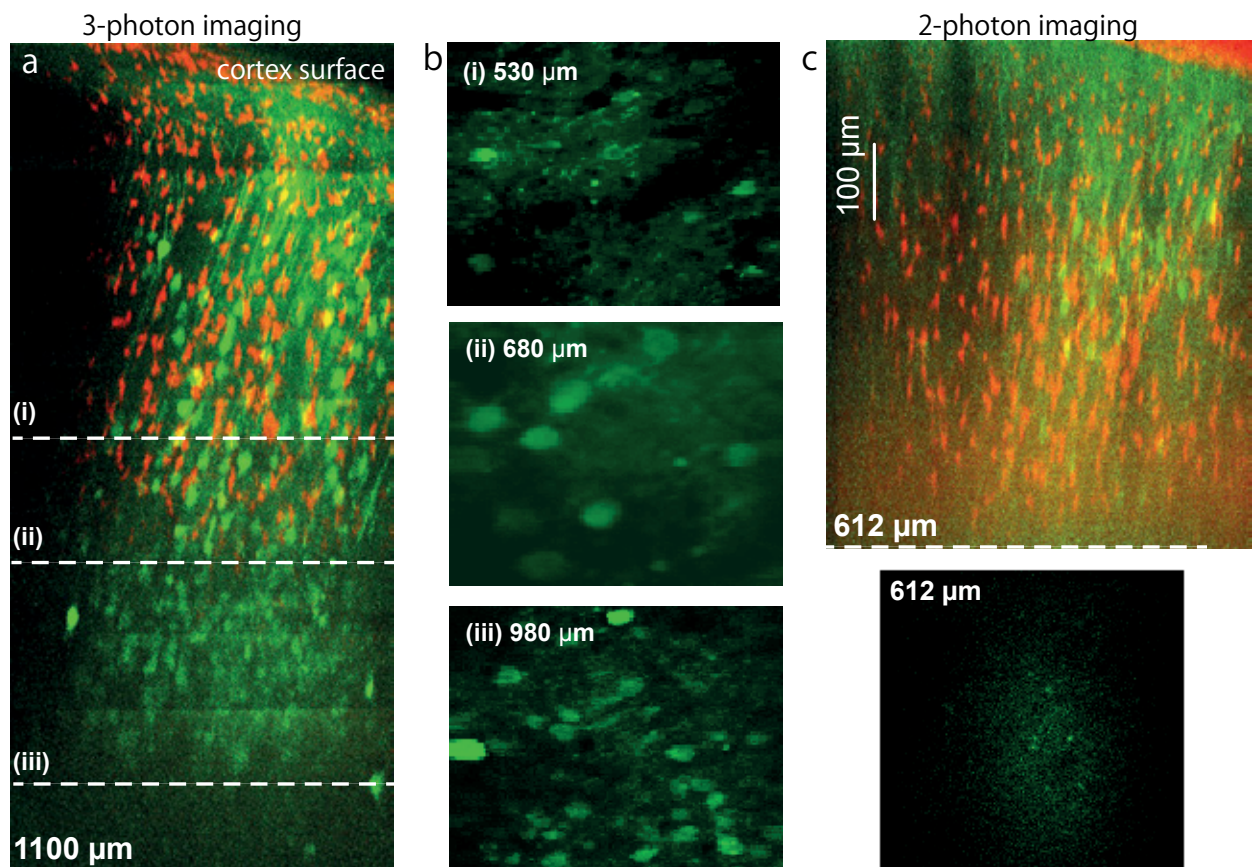


Figure 2. Structural imaging using two- or three-photon excitation. a. Overlay of GCaMP6s (green) and sulforhodamine 101 (red) labelling excited at 1300 nm. Sequential images were acquired at increasing depth, then projected over one lateral dimension as a maximum intensity projection. b. Individual image planes from the side-projection shown in (a) at the indicated depths. c. same tissue staining and image preparation as in (a) with excitation at 920 nm. Lower panel shows an individual image plane at 612 μm .

Abbildung 2: Darstellung von Strukturen mittels Zwei- und Dreiphotonenanregung. a. Überlagerung von GCaMP6s- (grün) und Sulforhodamin-101-Signalen (rot) bei einer Anregungswellenlänge von 1300 nm. Seitenprojektion von sequenziell mit zunehmender Tiefe aufgenommenen Bildern (Maximalintensitätsprojektion). b. Individuelle Bildebenen von Seitenprojektionen aus (a) bei angezeigter Tiefe. c. Gleiche Gewebefärbung und Bildpräparation wie in (a) bei einer Anregungswellenlänge von 920 nm. Unten ist eine individuelle Abbildungsebene in einer Tiefe von 612 μm dargestellt.

scattering of the excitation light due to the longer wavelength and theoretically should extend the capability to use imaging techniques for monitoring neuronal activity substantially deeper into the brain. Furthermore, three-photon absorption is much more strongly dependent on peak excitation laser intensity, which increases the SBR in deep imaging conditions (Figure 1a, 1b). The combined effect of the three-photon technique should almost eliminate the problems associated with out-of-focus fluorescence [13].

To test whether this approach could be used to improve the depth limit for imaging neuronal activity, we equipped the original RAMM instrument [12]

längen anzuregen (Abbildung 1). Üblicherweise verwendete grüne Kalziumindikatoren wie GCaMP6s erreichen eine maximale Effizienz bei der Zweiphotonenabsorption, wenn sie mittels Laserpulsen um 920 nm angeregt werden. Im Gegensatz dazu ist die Dreiphotonenabsorption bei 1300 nm in hohem Maße effizient (Abbildung 1). Dies führt zu einer signifikanten Reduzierung der Streuung des anregenden Lichtes bei höheren Wellenlängen und sollte theoretisch bildgebenden Verfahren zur Beobachtung neuronaler Aktivität ermöglichen, tiefer in das Gehirn vorzudringen. Des Weiteren hängt die Dreiphotonenabsorption erheblich stärker von der Spitzenintensität des

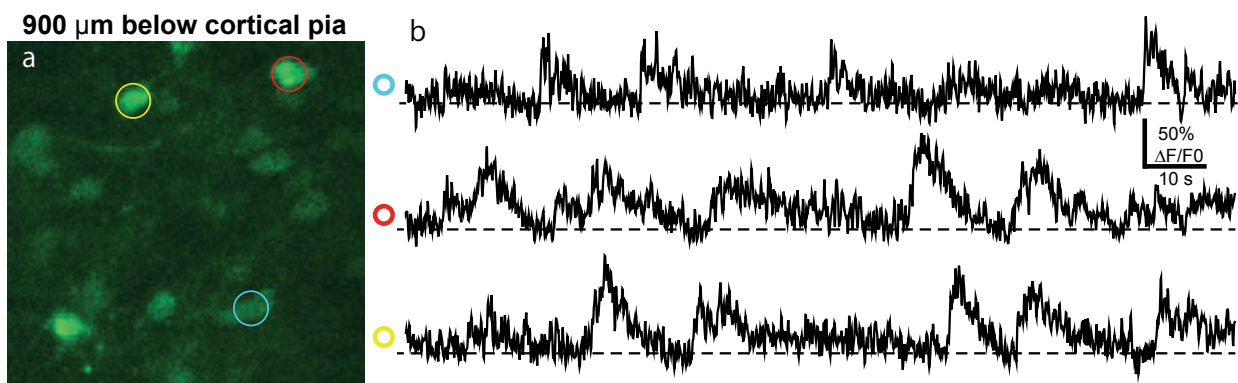


Figure 3. Calcium imaging of spontaneous neuronal activity in mouse primary visual cortex under anesthesia. a. Overview image taken at 900 µm below pia. Colored ellipses mark neurons for which kinetic traces are shown in b. b. Ca^{2+} -transient traces from the neurons indicated in a.

Abbildung 3. Kalziumsignale spontaner neuronaler Aktivität im primären visuellen Kortex der Maus unter Anästhesie. a. Übersichtsbild in einer Tiefe von 900 µm unterhalb der Pia. Farbige Ellipsen markieren Neuronen und in b. deren Kalziumtransienten.

with an optical parametric amplifier (OPA) that can generate a broad range of wavelengths extending up to 2400 nm. This also involved optimizing the optical pathway for greater transmission at 1300 nm (Figure 1). To label neurons, we use the genetically encoded calcium indicator, GCaMP6s [3] which was targeted to neurons using a virus vector and provides strong signals with low background. We then imaged neurons in rat visual cortex using two-photon excitation at 920 nm and three-photon excitation at 1300 nm to compare the extent of imaging capabilities of both excitation methods (Figure 2). Out-of-focus fluorescence emerges at 400-500 µm in both green and red channels under the two-photon microscope and degrades the SBR of calcium imaging (Figure 2). The three-photon excitation microscope detects structures beyond 1 mm (Figure 2b) in the rat cortex and neuronal activity has been observed, so far, down to >900 µm (Figure 3d).

These preliminary results suggest that the fundamental depth limit of two-photon microscopy can be efficiently overcome by the use of three-photon excitation usable at frame rates high enough to measure calcium transients. Many other challenges arise, however, for deep imaging systems: as the imaging depth increases, the collection of emitted fluorescence drops and the signal to noise ratio of the system decreases, resulting in more noisy recordings and less reliable detection of neuronal activity. To fully understand

anregenden Lasers ab, wodurch das SBR bei Messungen in tiefen Kortexschichten weiter verbessert wird (Abbildung 1a,b). Zusammengekommen sollten diese Eigenschaften der Dreiphotonenmikroskopie die durch fokusferne Fluoreszenz verursachten Probleme annähernd aufwiegen [13].

Um zu testen, ob dieser Ansatz die Aufnahme neuronaler Aktivität in tiefer gelegenen Schichten des Kortex ermöglicht, erweiterten wir das RAMM-Mikroskop [12] mit einem optisch parametrischen Verstärker (OPA), der in der Lage ist, ein breites Spektrum von Wellenlängen bis zu 2400 nm zu generieren. Außerdem mussten wir den optischen Übertragungsweg des Laserstrahls weit genug optimieren, um den Energieverlust bei einer Anregungswellenlänge von ~1300 nm zu minimieren (Abbildung 1). Wir markierten die Neuronen mit GCaMP6s [3], einem durch einen Virusvektor eingeschleusten genetisch kodierten Kalziumindikator. GCaMP6s erzeugt im Verhältnis zum Hintergrundrauschen ein sehr starkes Signal. Anschließend registrierten wir die neuronale Aktivität im visuellen Kortex von Ratten sowohl mit einer Zweiphotonenanregung bei einer Wellenlänge von 920 nm als auch mit einer Dreiphotonenanregung bei einer Wellenlänge von 1300 nm, um die Grenzen beider bildgebenden Verfahren zu vergleichen (Abbildung 2). Im Falle der Zweiphotonenmikroskopie entsteht fokusferne Fluoreszenz ab einer kortikalen Tiefe von



the function of the brain requires quantification of the activity of neuronal populations at all depths of the cortex, and the three-photon excitation technique described here provides a way that this can be achieved for deeper cortical regions.

400–500 μm , wodurch sich das SBR deutlich verschlechtert (Abbildung 2). Mit Hilfe der Dreiphotonenmikroskopie konnten wir im Kortex der Ratte Strukturen in über 1 mm Tiefe auflösen (Abbildung 2b) und bis zum jetzigen Zeitpunkt neuronale Aktivität bis in eine Tiefe von über 900 μm registrieren (Abbildung 3d).

Diese noch vorläufigen Resultate deuten darauf hin, dass die fundamentale Tiefenbegrenzung der Zweiphotonenmikroskopie überwunden werden kann und eine zeitliche Auflösung erreicht wird, die die Messung von schnellen Kalziumtransienten ermöglicht. Es ergeben sich jedoch noch viele weitere Herausforderungen für die Mikroskopie in den tiefen kortikalen Hirnregionen. Mit Zunahme der Abbildungstiefe sinkt die Erfassungsrate für die emittierte Fluoreszenz und damit auch das Signal-Rausch-Verhältnis stark ab. Dies führt zu einer weniger zuverlässigen Registrierung neuronaler Aktivität. Um die Funktion des Gehirns vollständig zu verstehen, benötigen wir jedoch eine quantifizierbare Aufnahme der Aktivität neuronaler Populationen aus allen Schichten des Kortex. Die hier beschriebene Dreiphotonenanregung zeigt einen Weg auf, um dies für die tieferen kortikalen Regionen zu erreichen.

Accurate inference of neuronal spiking *in vivo* using quantitative biophysical-based models of calcium sensor proteins

David S. Greenberg, Damian J. Wallace, Silvia Wuertenberger, Uwe Czubayko, Kay-Michael Voit, Arne Monsees, Reinhard Seifert*, Yvonne Groemping & Jason N. D. Kerr

Department of Behavior and Brain Organization

*Department of Molecular Sensory Systems

The combination of modern imaging techniques and the latest neuronal activity sensors provide a vast array of new possibilities for quantifying the activity of populations of neurons *in vivo*. However, the most important form of activity occurring in neurons is an electrical discharge known as an action potential (AP), and it is the occurrence and timing of action potentials in individual neurons which is critical for brain function. The occurrence of an action potential in one neuron allows that neuron to influence the activity of other downstream neurons, much the same way that individual components in an electric circuit influence each other, and it is this property which is thought to endow the brain with its power for complex signal processing and computation. Therefore, in order to use imaging technologies to investigate brain function, a method that can accurately infer the occurrence of action potentials from images of neurons in the brain is required.

Currently the most commonly used technique for detecting action potentials (APs) using imaging technologies uses fluorescent calcium indicators. When a neuron discharges an AP, voltage-gated calcium channels in the cell membrane open and there is a large influx of calcium [14]. Fluorescent calcium indicators, which increase their fluorescence upon binding calcium ions, can therefore be used to determine AP discharge times. Furthermore, when the relationship between AP discharge and fluorescence changes is known, it is possible to develop algorithms which accurately infer the occurrence of action potentials from the fluorescence data alone [15].

Präzise Inferenz neuronaler Aktionspotentiale (*in vivo*) mithilfe quantitativer biophysikalischer Modelle proteinbasierter Kalziumsensoren

Die Kombination von modernen Bildgebungstechniken mit den neuesten Neuronenaktivitätsindikatoren eröffnet eine Vielzahl neuer Möglichkeiten für die Quantifizierung der Aktivität von Neuronenpopulationen *in vivo*. Die wichtigste Form von neuronaler Aktivität ist jedoch eine elektrische Entladung, die als Aktionspotenzial (AP) bekannt ist. Deren Auftreten sowie die zeitliche Abfolge dieser Aktionspotenziale sind entscheidend für die Hirnfunktion. Das Auftreten eines Aktionspotenzials in einem Neuron erlaubt es diesem, die Aktivität anderer nachgeschalteter Neuronen zu beeinflussen, ähnlich der Wechselwirkung einzelner Komponenten in einem elektrischen Schaltkreis. Von dieser Eigenschaft wird angenommen, dass sie das Gehirn mit der Fähigkeit zur komplexen Signalverarbeitung und Berechnung ausstattet. Um Bildgebungsverfahren zur Untersuchung von Hirnfunktionen verwenden zu können, wird daher eine Methode benötigt, mit der man das Auftreten von Aktionspotenzialen präzise aus Bildaufnahmen von Neuronen im Gehirn ableiten kann (Inferenz).

Die derzeit gängigste Methode zur Detektion von Aktionspotenzialen (AP) mittels bildgebender Verfahren basiert auf fluoreszierenden Kalziumindikatoren. Wenn ein Neuron ein AP entlädt, öffnen sich spannungsgesteuerte Kalziumkanäle in der Zellmembran und es kommt zu einem starken Einstrom von Kalzium [14]. Fluoreszierende Kalziumindikatoren, die ihre Fluoreszenz bei Bindung von Kalziumionen erhöhen, können demzufolge verwendet werden, um den Zeitpunkt der AP-Entladung zu ermitteln. Sofern die Beziehung zwischen der Entladung eines AP und

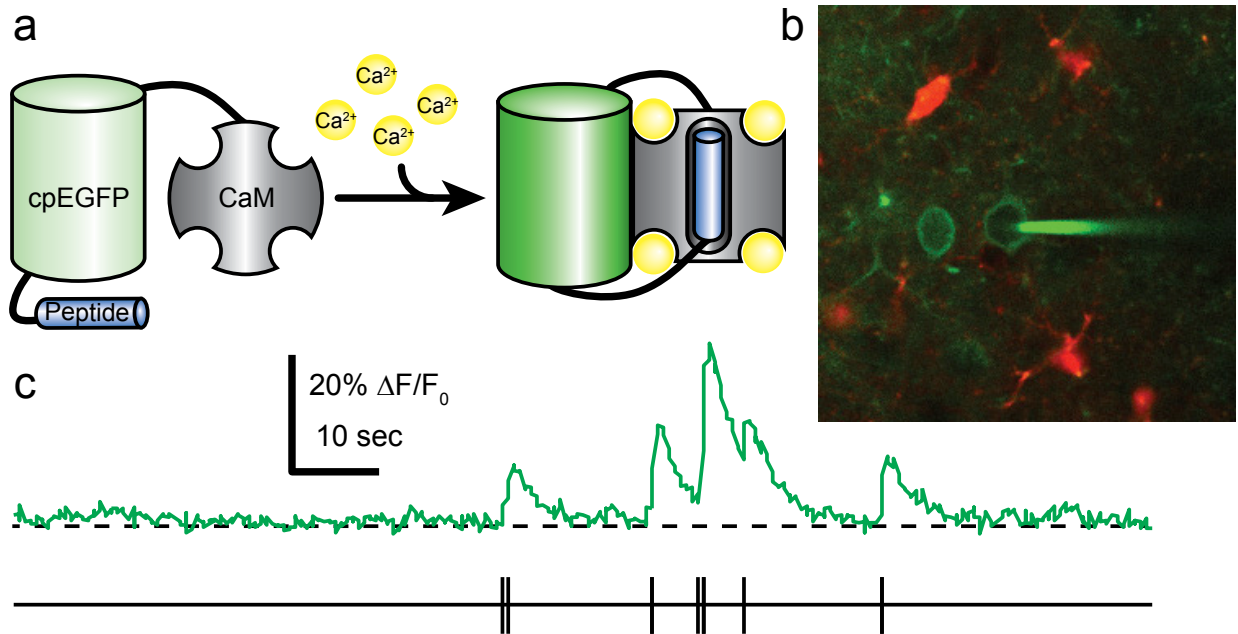


Figure 1. GCaMP6s overview. a. Schematic representation of calcium-dependent conformational changes within GCaMP6s, which consists of a circularly permuted eGFP subunit linked to Calmodulin (CaM) and a CaM-binding peptide. These conformational changes are accompanied by a large fluorescence increase as depicted by the colours of the eGFP moiety. b. *In vivo* imaging of GCaMP6s-expressing neurons layer 2/3 in mouse visual cortex with cell-attached electrical recording of APs from one neuron. c. Simultaneous recording of GCaMP6s fluorescence signals and electrically detected APs.

Abbildung 1. GCaMP6s Übersicht. a. Schematische Darstellung der kalziumabhängigen Konformationsänderungen in GCaMP6s, das aus einer zirkulär permutierten eGFP-Untereinheit besteht, die an Calmodulin (CaM) und an ein CaM-bindendes Peptid gekoppelt ist. Diese Konformationsänderungen werden begleitet von einer großen Fluoreszenzzunahme dargestellt durch die Farben der eGFP-Einheit. b. *In vivo*-Bildraten von GCaMP6s-exprimierenden Neuronen aus Lamina 2/3 im visuellen Kortex der Maus mit "cell-attached" elektrophysiologischen Aufnahmen von APs aus demselben Neuron. c. Simultane Aufnahmen der GCaMP6s-Fluoreszenzsignale und elektrisch detektierter APs.

The first approach for using fluorescent calcium indicators to image neuronal activity *in vivo* employed small synthetic molecules which were injected directly into the brain area of interest. While this technique had the advantage that inferring action potential occurrence from the fluorescent imaging data was relatively reliable, the significant disadvantage was that these sensors provided only a few hours of data before being metabolized or sequestered into organelles [16]. This limits data collection to a single recording session, and observing changes in the activity of individual neurons or neuronal populations during learning, for example, was not possible. In contrast, genetically encoded calcium sensitive proteins are produced continuously by the imaged neurons, introducing the possibility of multiple recording sessions over days and weeks.

der Fluoreszenzänderung bekannt ist, ist es weiterhin möglich Algorithmen zu entwickeln, welche das Auftreten von APs allein aus Fluoreszenzdaten ableiten [15].

Die erste Methode, um Hirnaktivität *in vivo* mittels fluoreszierender Kalziumindikatoren abzubilden, verwendete kleine synthetische Moleküle, die direkt in das zu untersuchende Hirnareal injiziert wurden. Während diese Technik den Vorteil besaß, dass das Auftreten von APs aus Fluoreszenzaufnahmen relativ zuverlässig gefolgert werden konnte, hatte sie jedoch den erheblichen Nachteil, dass diese Sensoren nur wenige Stunden lang Daten bereitstellen konnten, bevor sie abgebaut oder in Organellen aufgenommen wurden [16]. Dies begrenzte die Datenaufnahme auf eine einzelne Aufnahmesitzung, und es war beispielsweise nicht möglich, die Änderung der Aktivität einzelner Neuronen oder Neuronenpopulationen während

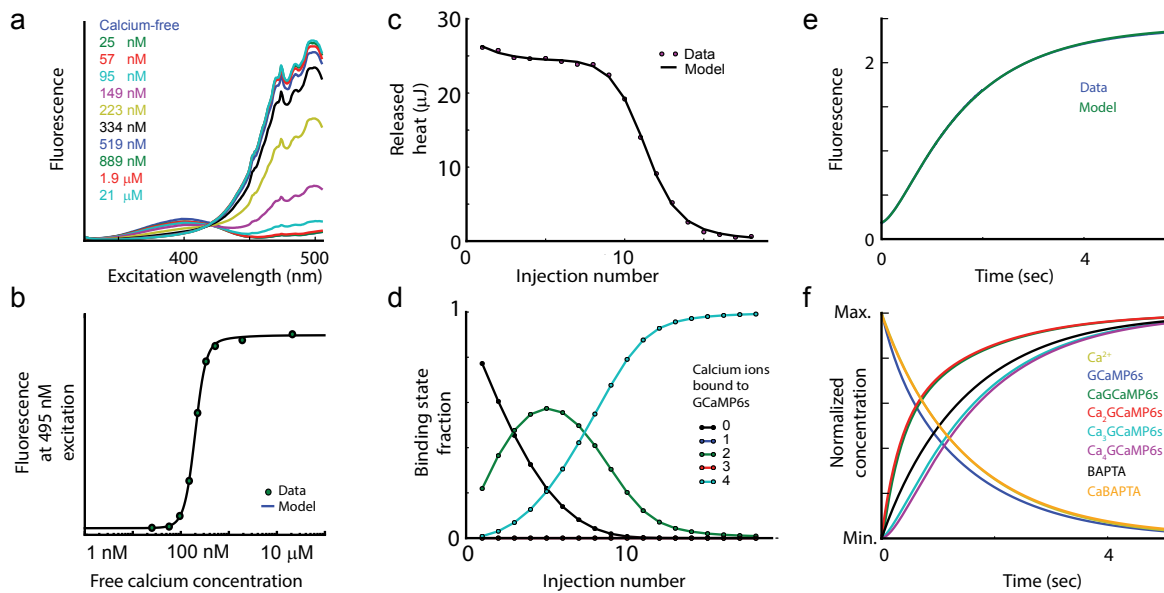


Figure 2. Biophysical data and model fits. **a.** Fluorescence excitation spectra of purified GCaMP6s in the presence of varying free calcium concentrations observed at 540 nm emission. **b.** Fluorescence intensity at 495 nm excitation and 540 nm emission plotted against the free calcium concentration (green circles). The data were fitted to a 4-site cooperative binding model (black curve). **c.** Integrated heat signals (purple circles) from each injection during an isothermal titration of GCaMP6s with calcium. Data were fit with a 4-site cooperative binding model with different binding enthalpies for each step (black curve). **d.** Calculated fractions of GCaMP6s bound to 0-4 calcium ions throughout the titration process, as determined by the model fit. **e.** Fluorescence measurement over time during binding of calcium to GCaMP6s (blue) and model fit (green). Data were obtained by stopped-flow mixing of two solutions, one containing 230 nM free calcium and the other containing 1 μM GCaMP6s. **f.** plot showing relative concentration changes over time of GCaMP6s bound to 0-4 calcium ions as well as the calcium-bound and calcium-free solution (BAPTA).

Abbildung 2. Biophysikalische Daten und Fits. **a.** Fluoreszenzanregungsspektren von gereinigtem GCaMP6s in Anwesenheit von unterschiedlichen Konzentrationen an freiem Kalzium, bei einer Emissionswellenlänge von 540 nm. **b.** Fluoreszenzintensität bei 495 nm Anregung und 540 nm Emission, aufgetragen gegen die freie Kalziumkonzentration (grüne Kreise). Diese Daten wurden angepasst an ein 4-Bindungsstellen-Modell (schwarze Kurve). **c.** Integrierte Signale der Wärmefreisetzung (violette Kreise) für jede Injektion während einer isothermen Titration von GCaMP6s mit Kalzium. Die Daten wurden angepasst an ein kooperatives Bindungsmodell mit 4 Ligandenbindungsstellen. **d.** Anhand des Modells berechnete Fraktionen von GCaMP6s gebunden an 0-4 Kalziumionen über den gesamten Titrationsprozess. **e.** zeitabhängige Fluoreszenzmessung während der Bindung von Kalzium an GCaMP6s (blau) und Fit (grün). **f.** Graph der relativen Konzentrationsänderungen von GCaMP6s gebunden an 0 bis 4 Kalziumionen gegen die Zeit, inklusive der Konzentrationsänderungen des kalziumgebundenen und kalziumfreien BAPTA-Puffers.

While the first genetically encoded sensors responded only weakly to neural activity and did not report all neuronal activity, the recently developed GCaMPs (Figure 1a) are dramatically more sensitive and report the majority of action potentials in most labelled neurons [3]. GCaMPs consist of three parts: circularly permuted green fluorescent protein (cpGFP), the calcium-binding protein calmodulin (CaM) and a CaM-interacting peptide derived from the protein MLCK (smooth myosin light chain kinase) (Figure 1a) [3]. Binding of Ca^{2+} to the CaM subunit leads to an interaction with the peptide and a subsequent conformational change. These changes result in up to a 50-fold fluorescence

Lernprozessen zu verfolgen. Im Gegensatz dazu werden genetisch kodierte kalziumsensitive Proteine fortlaufend vom optisch auszulesenden Neuron produziert und ermöglichen somit mehrere Aufnahmesitzungen über Tage oder Wochen.

Während die ersten genetisch kodierte Sensoren nur schwach und nicht auf jegliche neuronale Aktivität reagierten, sind die kürzlich entwickelten GCaMPs (Abbildung 1a) bedeutend sensibler und zeigen die Mehrzahl der APs in den meisten markierten Neuronen an [3]. GCaMPs bestehen aus drei Teilen: dem zirkulär permutierten grün fluoreszierenden Protein (cpGFP), dem kalziumbindenden Protein Calmodulin (CaM) und

increase compared to the dim calcium-free state, which enables detection of single APs *in vivo* (Figure 1b-c).

However, determining the precise relationship between AP discharge and changes in fluorescence over time has so far been impossible for GCaMPs or other protein-based calcium indicators, because the process of calcium binding to GCaMP's CaM subunit (Figure 1a) is considerably more complex than binding to small molecule indicators. Firstly, while small molecule indicators bind a single calcium ion, GCaMPs bind four calcium ions in a cooperative manner, so that when one calcium-binding site is filled the affinity of other sites can change. As a result, small molecule indicators increase their fluorescence linearly with the number of discharged APs while this relationship is nonlinear for GCaMPs. Secondly, small molecule indicators bind calcium within a few milliseconds, so that for typical *in vivo* image acquisition rates of 10-100 Hz any deviations from binding equilibrium have a negligible effect on the recorded fluorescence data. In contrast, for GCaMP the complex kinetics of these binding state transitions extend over hundreds of milliseconds and remain poorly understood [17]. Therefore, understanding GCaMP's kinetics is essential for quantitative analysis of its fluorescence signals and inference of AP discharge times. Finally, while procedures for loading neurons with small molecule indicators lead to a relatively narrow range of indicator concentrations in the imaged neurons [16], genetically encoded sensors can exhibit a much greater range of concentrations across animals or within the same animal, and this variation can strongly affect the recorded fluorescence signals [18].

In order to determine affinities as well as the critical kinetic rate constants for GCaMP's individual binding steps, we performed a number of biophysical experiments using GCaMP6s, the most sensitive of the GCaMP sensors. We first measured changes in GCaMP6s fluorescence *in vitro* as the calcium concentration increases. We observed a shift in the excitation spectrum from shorter to longer wavelengths (Figure 2a), with the greatest

einem Peptid, welches mit CaM interagiert und vom Protein MLCK ("smooth myosin light chain kinase") [3] abgeleitet ist (Abbildung 1a). Die Bindung von Ca^{2+} an die CaM-Untereinheit führt zu einer Interaktion mit dem Peptid und einer nachfolgenden Konformationsänderung. Diese Änderungen haben einen bis zu fünfzigfachen Fluoreszenzanstieg im Vergleich zum dunklen kalziumfreien Zustand zur Folge, welches die Detektion einzelner APs *in vivo* ermöglicht (Abbildung 1b-c).

Es war dennoch bislang unmöglich, den genauen Zusammenhang zwischen der Entladung eines AP und der zeitabhängigen Fluoreszenzänderung für GCaMPs oder andere proteinbasierte Kalziumindikatoren zu ermitteln, da der Prozess der Kalziumbindung an GCaMPs CaM-Untereinheit (Abbildung 1a) wesentlich komplexer ist als die Kalziumbindung an niedermolekulare Indikatoren. Erstens binden GCaMPs vier Kalziumionen auf kooperative Weise, sodass sich, wenn eine Kalziumbindungsstelle besetzt ist, die Affinität für die anderen Stellen ändern kann, während niedermolekulare Indikatoren nur ein einzelnes Kalziumion binden. Infolgedessen nimmt die Fluoreszenz von niedermolekularen Indikatoren linear mit der Anzahl der entladenen APs zu, während dieser Zusammenhang für GCaMPs nichtlinear ist. Zweitens binden niedermolekulare Indikatoren Kalzium innerhalb weniger Millisekunden, sodass bei typischen *in vivo* Bildaufnahmegeschwindigkeiten von 10 bis 100 Hz jede Abweichung vom Bindungsgleichgewicht einen vernachlässigbaren Effekt auf die aufgenommenen Fluoreszenzdaten hat. Im Gegensatz dazu erstrecken sich die komplexen Kinetiken dieser Bindungsvorgänge von GCaMP über hunderte von Millisekunden und wurden bisher nur unzureichend verstanden [17]. Daher ist das Verständnis der GCaMP-Kinetik entscheidend für die quantitative Analyse seiner Fluoreszenzsignale und die Inferenz der Entladungszeiten von APs. Darüber hinaus führen Verfahren zur Beladung von Neuronen mit niedermolekularen Indikatoren zu einer relativ engen Konzentrationsverteilung in den optisch ausgelesenen Neuronen [16], während

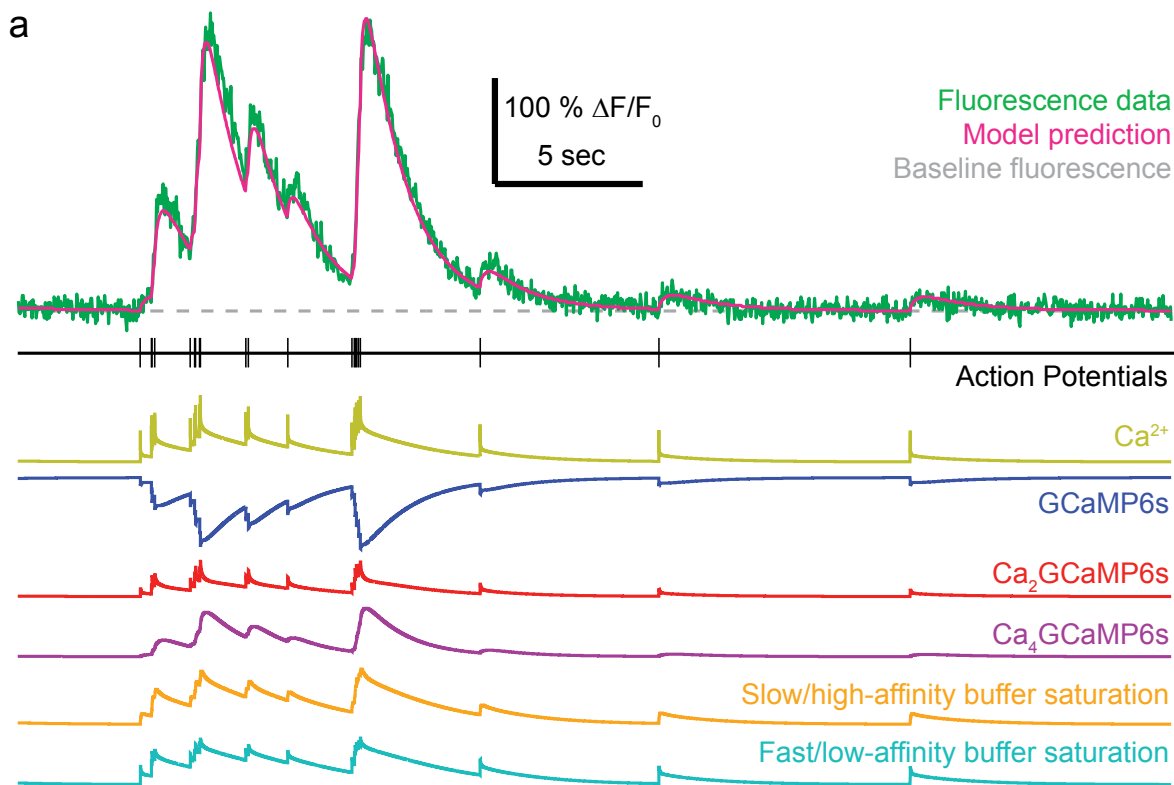


Figure 3. Fluorescence and model fit to *in vivo* fluorescence data. a. Fit of extended kinetic GCaMP6s model to *in vivo* data showing binding states, free calcium, endogenous buffering, calcium extrusion and model predictions of total and baseline fluorescence.

Abbildung 3. Fluoreszenzdaten und Modell-Fit. a. Fit des erweiterten kinetischen Modells auf *in vivo*-Daten zeigt die unterschiedlichen Bindungszustände, freies Kalzium, endogene Puffer, Kalziumausstrom und Modellvorhersage für die totale und die Basislinienfluoreszenz.

fluorescence increase at 495 nm. The fluorescence exhibited a sigmoidal dependence on calcium concentration that could be explained by a 4-site binding model (Figure 2b). However, fluorescence data cannot be used to precisely establish the affinity of all calcium-binding steps, since some of these steps may leave the fluorescence unchanged.

To characterize all binding-state transitions and their dependence on calcium, we employed isothermal titration calorimetry (ITC), a universal technique for detecting heat absorbed or generated when molecules interact. When a calcium solution is titrated into a solution with GCaMP6s, heat is released upon the binding of calcium to the protein until all binding sites become saturated (Figure 2c). These data can be used to fit a model describing the affinity and binding enthalpy for each step, as well as concentrations of the different GCaMP6s- Ca^{2+} complexes at each stage of the titration (Figure 2d).

genetisch kodierte Indikatoren eine viel größere Konzentrationsspanne bei einer Gruppe von Tieren oder in einem einzelnen Tier aufweisen können. Diese Schwankungen können das aufgenommene Fluoreszenzsignal stark beeinflussen [18].

Um sowohl die Affinitäten als auch die entscheidenden kinetischen Ratenkonstanten für die einzelnen Bindungsschritte von GCaMPs zu bestimmen, führten wir eine Reihe von biophysikalischen Experimenten unter Verwendung von GCaMP6s durch, dem sensitivsten der GCaMP-Indikatoren. Zuerst erfassten wir Änderungen der GCaMP6s-Fluoreszenz *in vitro* bei einer Zunahme der Kalziumkonzentration. Wir beobachteten eine Verschiebung im Anregungsspektrum von kurzen hin zu langen Wellenlängen, mit einem maximalen Fluoreszenzanstieg bei 495 nm. Die Fluoreszenzänderung folgt einem sigmoidalen Verlauf in Abhängigkeit von der Kalziumkonzentration, der

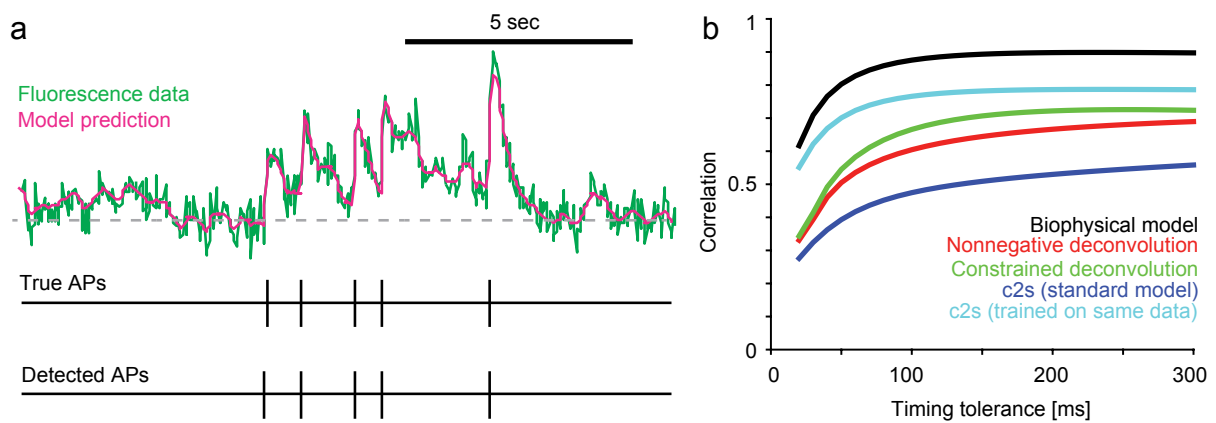


Figure 4. *In vivo* data and model performance. a. Fluorescence data recorded *in vivo* (green) and model fit (pink) also showing electrophysiologically detected APs (True APs) and APs inferred using the biophysical model and SMC algorithm (Detected APs). b. Correlation between true and detected AP discharge times as a function of the timing precision, for 18 layer 2/3 pyramidal neurons in mouse V1 and comparison with neural network-based approach c2s [20], nonnegative deconvolution [21] and constrained deconvolution [22].

Abbildung 4. *In vivo*-Daten und Modellergebnis. a. Fluoreszenzdaten aufgenommen *in vivo* (grün) mit elektrisch detektierten APs (reale APs) und APs ermittelt durch die Verwendung des biophysikalischen Modells und SMC-Algorithmus mit 10.000 Simulationen (detektierte APs). b. Korrelation zwischen realen und detektierten AP-Entladungszeiten als Funktion der Zeitgenauigkeit, für 18 pyramidale Neuronen (Lamina 2/3) im Maus-V1-Kortex. Vergleich des Modells mit der auf neuronalen Netzwerken basierenden Methode c2s [20], nicht-negativer Dekonvolution [21] und eingeschränkter Dekonvolution [22].

While ITC is far more informative about the calcium-binding process than a simple fluorescence titration, it can only provide information about the system at equilibrium, not about the kinetic properties of the individual binding steps. However, accurate detection of AP discharge times *in vivo* relies on fluorescence measurements <100 ms after AP discharge, when the binding kinetics have not yet reached equilibrium. Consequently, models of GCaMP- Ca^{2+} interaction based solely on measurements at equilibrium cannot predict fluorescence responses to AP discharge *in vivo*. We therefore employed stopped-flow fluorimetry, a technique in which solutions of GCaMP and calcium are rapidly mixed (< 1ms) and the resulting fluorescence changes are observed over time (Figure 2e). These measurements can then be compared to a mathematical model describing the rate at which each binding step proceeds as a function of the calcium concentration, as well as changes in the concentration of each of GCaMP's binding states over time (Figure 2f). Since ITC provides information about GCaMP's calcium binding at equilibrium while stopped-flow provides information on reaction kinetics, these two methods complement each other to give a more complete characterization of the indicator-calcium interactions.

durch ein Modell mit vier Bindungsstellen erklärt werden kann (Abbildung 2b). Allerdings reichen die Fluoreszenzexperimente allein nicht aus, um die Affinität aller Kalziumbindungsschritte präzise zu bestimmen, da nicht alle Schritte auch eine Fluoreszenzänderung bewirken müssen.

Um alle Bindungsvorgänge und ihre Abhängigkeit von Kalzium zu charakterisieren, verwendeten wir die isotherme Titrationskalorimetrie "isothermal titration calorimetry" (ITC), eine universelle Technik, mit der die Bindungswärme, die aufgenommen oder freigesetzt wird, wenn zwei Moleküle interagieren, gemessen werden kann. Wenn eine Kalziumlösung in eine GCaMP6s-Lösung titriert wird, wird bei Kalziumbindung des Proteins solange Wärme frei, bis alle Bindungsstellen gesättigt sind (Abbildung 2c). Diese Daten können verwendet werden, um sie in ein Modell einzupassen, das die Affinitäten und Bindungsenthalpien für jeden einzelnen Schritt sowie die Konzentrationen der unterschiedlichen GCaMP6s- Ca^{2+} -Komplexe bei jedem Schritt der Titration beschreibt (Abbildung 2d).

Obwohl die ITC-Daten weit mehr Informationen über den gesamten Kalziumbindungsprozess liefern können als die Fluoreszenztitrations, betrifft dies nur die Situation im Gleichgewicht.

We further tested whether this modeling approach could be used to describe *in vivo* calcium imaging data. In order to apply our kinetic binding models to GCaMP data acquired from neurons *in vivo*, we extended these models to incorporate calcium influx upon AP discharge, calcium efflux back to the resting concentration of the neuron, calcium buffering by endogenous proteins, drifting baseline fluorescence, photon shot noise and variable GCaMP fluorescence across neurons (Figure 3). To infer AP times from fluorescence signals using these models, we developed algorithms based on Sequential Monte Carlo (SMC) [19]. The SMC algorithm is a data-driven simulation technique in which random simulations are compared to time series data. Simulations consistent with the fluorescence data produce multiple “descendants” on the next time step, while those inconsistent with the data “die out”. In the limit of many simultaneous simulations, SMC converges to Bayesian inference under fairly general conditions. Therefore, at this point we have a biophysically-informed model of the relationship between Ca^{2+} influx occurring during an AP and the resulting fluorescence change reported by the GCaMP6s calcium indicator, which can be used for inferring AP discharge and timing from *in vivo* imaging data.

To measure the accuracy of AP discharge sequences inferred using our biophysical model and SMC algorithm, we used experimental data in which APs were recorded electrically and optically from the same neuron *in vivo* (Figure 1, 3 and 4). Across the dataset of 18 neurons, the average detection rate was 90% (when imposing a requirement that the time at which the detected AP matched the timing of the real AP with an accuracy less than 200 ms), with a false positive detection rate of 0.2 Hz. This approach outperformed all currently available methods in accurately inferring AP times based on fluorescence signals recorded from calcium sensor proteins (Figure 4b).

Accurate inference of AP discharge times from *in vivo* imaging data is essential in order to make best use of the numerous advantages that imaging technologies can provide in the pursuit of a deeper

Die kinetischen Eigenschaften der Kalziumbindung können mit dieser Methode nicht ermittelt werden. Allerdings beruht die genaue Bestimmung von AP-Verlaufszeiten *in vivo* auf Fluoreszenzmessungen von weniger als 100 ms nach Auftreten des APs, wenn die Bindungskinetiken noch kein Gleichgewicht erreicht haben. Dementsprechend können Modelle der GCaMP- Ca^{2+} -Interaktionen, die ausschließlich auf Gleichgewichtsmessungen basieren, keine Fluoreszenzänderungen bei AP-Entladung *in vivo* vorhersagen. Aus diesem Grund haben wir die Stopped-Flow-Fluorimetrie verwendet, eine Technik, in der Lösungen von GCaMP und Kalzium schnell (<1 ms) gemischt werden und die resultierenden Fluoreszenzänderungen über die Zeit beobachtet werden (Abbildung 2e). Diese Messdaten fließen dann in ein mathematisches Modell ein, das die Raten bei jedem Bindungsschritt in Abhängigkeit von der Kalziumkonzentration beschreibt sowie den zeitlichen Verlauf der Besetzung einzelner Bindungszustände des GCaMP-Moleküls darstellt (Abbildung 2f). Da die Titrationskalorimetrie Informationen über die Kalziumbindung im Gleichgewicht liefert, während mit der Stopped-Flow-Methode Reaktionskinetiken verfolgt werden, komplementieren sich diese beiden Methoden, wodurch eine genauere Charakterisierung der Interaktionen zwischen Indikator und Kalzium möglich wird.

Ferner haben wir untersucht, ob dieser Modellierungsansatz genutzt werden kann, um kalziuminduzierte Fluoreszenzänderungen *in vivo* zu beschreiben. Um unsere kinetischen Bindungsmodelle auf Daten zu übertragen, die mit Hilfe von GCaMP in Neuronen gemessen wurden, haben wir unsere Modelle erweitert, um zusätzliche Parameter zu berücksichtigen: Kalziumeinstrom nach AP-Entladung, Kalziumausstrom zurück zur Ausgangskonzentration in Neuronen, Kalziumpufferwirkung endogener Proteine, Schwankungen in der Basislinienfluoreszenz, Photonen-Schrotrauschen und variable GCaMP-Fluoreszenz über das Neuron hinweg (Abbildung 3). Um das Auftreten eines AP aus den Fluoreszenzsignalen mithilfe dieser Modelle abzuleiten, haben



understanding of the function of the brain. The methods described here not only provide a highly accurate method for AP inference for data derived from neurons labelled with GCaMP6s, but also a highly flexible biophysically-informed technique that can be adapted to suit any future advances in calcium-sensitive indicator technology.

wir Algorithmen basierend auf "Sequential Monte Carlo" (SMC) entwickelt [19]. Der SMC-Algorithmus ist eine datengetriebene Simulationstechnik, in der zufällige Simulationen mit zeitabhängigen Folgen von Datenpunkten verglichen werden. Simulationen, die mit den Fluoreszenzdaten übereinstimmen, produzieren im nächsten Zeitschritt mehrere „Nachkommen“, während solche, die mit den Daten nicht übereinstimmen, „aussterben“. Begrenzt durch viele simultane Simulationen, konvergiert SMC zu Bayesscher Statistik unter recht allgemeinen Bedingungen. Als Folge erhalten wir ein biophysikalisch fundiertes Modell des Verhältnisses zwischen Ca^{2+} -Einfluss während eines APs und der resultierenden Fluoreszenzänderung, vermittelt durch den GCaMP6s-Indikator, das genutzt werden kann, um AP-Entladungen und -Zeitverläufe aus bildgebenden Daten *in vivo* abzuleiten.

Um die Genauigkeit der AP-Entladungssequenzen zu bestimmen, die wir mit Hilfe unseres biophysikalischen Modells und den SMC-Algorithmen erhalten haben, haben wir experimentelle Daten verwendet, in denen APs elektrisch und optisch von demselben Neuron *in vivo* aufgezeichnet wurden (Abbildung 1, 3, 4). In einem Datensatz von 18 Neuronen lag die durchschnittliche Detektionsrate bei 90% (unter der Voraussetzung, dass die Zeit des detektierten APs mit dem Zeitpunkt des realen APs mit einer Genauigkeit von weniger als 200 ms übereinstimmt) bei einer Rate für die Detektion von falsch Positiven von 0,2 Hz. Dieser Ansatz übertrifft alle bisher verfügbaren Methoden bezüglich der Genauigkeit, mit der AP-Zeiten basierend auf Fluoreszenzsignalen von Kalziumindikatorproteinen abgeleitet werden können (Abbildung 4b).

Eine genaue Ableitung von AP-Entladungszeiten aus *in vivo* bildgebenden Daten zu ermitteln ist von grundlegender Bedeutung, wenn man die vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten bildgebender Technologien bestmöglich nutzen will, um zu einem besseren Verständnis der Funktion des Gehirns zu gelangen. Die hier beschriebenen Verfahren stellen nicht nur eine höchst genaue Methode der AP-Detektion aus Daten dar, die

aus GCaMP6s-markierten Neuronen gewonnen wurden, sondern auch eine äußerst flexible biophysikalisch fundierte Technik, die an zukünftige Weiterentwicklungen von kalziumsensitiven Indikatoren angepasst werden kann.

References

- [1] Denk, W., Strickler, J.H. & W.W. Webb, W.W. (1990) "Two-photon laser scanning fluorescence microscopy" *Science* 248, 73-76
- [2] Akerboom, J. *et al.* (2013) "Genetically encoded calcium indicators for multi-color neural activity imaging and combination with optogenetics" *Front. Mol. Neurosci* 6, 2
- [3] Chen, T.W. *et al.* (2013) "Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity" *Nature* 499, 295-300
- [4] Wallace, D.J. *et al.* (2008) "Single-spike detection in vitro and in vivo with a genetic Ca²⁺ sensor" *Nat. Methods* 5, 797-804
- [5] Chuong, A.S. *et al.* (2014) "Noninvasive optical inhibition with a red-shifted microbial rhodopsin" *Nat. Neurosci.* 17, 1123-1129
- [6] Han, X. *et al.* (2011) "A high-light sensitivity optical neural silencer: development and application to optogenetic control of non-human primate cortex" *Front Syst. Neurosci.* 5, 18
- [7] Sawinski, J. *et al.* (2009) "Visually evoked activity in cortical cells imaged in freely moving animals" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 19557-19562
- [8] Kerr, J.N. & Denk, W. (2008) "Imaging in vivo: watching the brain in action" *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 195-205
- [9] Sawinski, J. *et al.* (2009) "Visually evoked activity in cortical cells imaged in freely moving animals" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 19557-19562
- [10] 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
- [11] Theer, P., Hasan, M.T. & Denk, D. (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
- [12] Mittmann, W. *et al.* (2011) "Two-photon calcium imaging of evoked activity from L5 somatosensory neurons in vivo" *Nat. Neurosci.* 14, 1089-1093.
- [13] Horton, N.G. *et al.* (2013) "In vivo three-photon microscopy of subcortical structures within an intact mouse brain" *Nat. Photonics* 7



- [14] Bean, B.P. (2007) "The action potential in mammalian central neurons" *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 451-465
- [15] Kerr, J.N., Greenberg, D. & Helmchen, F. (2005) "Imaging input and output of neocortical networks in vivo" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 14063-14068
- [16] Stosiek, C. *et al.* (2003) "In vivo two-photon calcium imaging of neuronal networks" *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 7319-7324
- [17] Sun, X.R. *et al.* (2013) "Fast GCaMPs for improved tracking of neuronal activity" *Nature communications* 4, p. 10.1038/ncomms3170
- [18] Hires, S.A., Tian, L. & Looger, L.L. (2008) "Reporting neural activity with genetically encoded calcium indicators" *Brain Cell Biol.* 36, 69-86
- [19] Gordon, N.J., D.J. Salmond, D.J. & Smith, A.F.M. (1993) "Novel approach to nonlinear/non-Gaussian Bayesian state estimation" *IEE Proceedings F - Radar and Signal Processing* 140, 107-113
- [20] Theis, L. *et al.* (2015) "Supervised learning sets benchmark for robust spike detection from calcium imaging signals" *bioRxiv*
- [21] Vogelstein, J.T. *et al.* (2010) "Fast non-negative deconvolution for spike train inference from population calcium imaging" *Journal of Neurophysiology* 104, 3691-3704
- [22] Pnevmatikakis, Eftychios A. *et al.* (2016) "Simultaneous Denoising, Deconvolution, and Demixing of Calcium Imaging Data" *Neuron* 89, 285-299

Contact

U. Benjamin Kaupp
Research Center caesar
Department of
Molecular Sensory Systems
Phone: +49 (0)228 9656-100
u.b.kaupp@caesar.de



Sperm are like grab bags – full of surprises

U. Benjamin Kaupp | Department of Molecular Sensory Systems
Stefan Hartmann | Press and Public Relations

Sperm need to find the egg if they are to fertilize it. Depending on animal species, they will encounter a large variety of conditions in the process. In humans, sperm need to cover a distance of 15-20 cm in a thick, viscous environment on the last stage

Spermien sind wie Wundertüten – voller Überraschungen

Spermien müssen für die Befruchtung die Eizelle finden. Je nach Tierart begegnen sie dabei ganz unterschiedlichen Bedingungen. Beim Menschen müssen die Spermien auf der letzten Etappe in einem zähflüssigen Milieu eine Strecke von 15-20 cm



of their journey along the oviduct. In contrast, fish and other marine creatures fertilize the egg outside the female body. For instance, sea urchins, the best known model organism in sperm research, live in colonies on the sea floor and release eggs and sperm synchronously once a year. While sperm can move freely in all directions in water, there are also infinite opportunities for them to miss their target in this habitat. The chemical environment differs considerably according to whether salt water, fresh water or the oviduct is involved. Despite these different conditions, however, there is a common factor of these seemingly different fertilization processes: sperm are lured to the egg by means of chemical or physical signals. In the sperm cell, these signals are converted into cellular or electric signals, thereby influencing sperm's swimming behavior. If the stimuli consist of chemical substances, i.e. chemoattractant molecules, which are released by the egg or its surroundings, this is referred to as chemotaxis. Other known sperm navigation strategies include rheotaxis (orientation based on fluid currents) and thermotaxis (orientation based on temperature differences).

Over the course of evolution, the different challenges that sperm must overcome in their search for the egg have led to a variety of navigation strategies (Figure 1). Little is known about the navigation of human sperm, while the speculation surrounding the subject is all the greater. In contrast, sea urchin sperm map the "chemical landscape" of an attractant very accurately. To "read" this sort of chemical concentration field, they have developed a swimming style along helical pathways as a robust navigation strategy. However, do these various navigation strategies become apparent in signaling? Is there a universal biochemical signaling pathway that varies only slightly from one animal species to another, or do these signaling pathways differ fundamentally? One thing is for sure: the "aim" of all these signaling pathways is to regulate the calcium concentration in the cell, as the calcium concentration controls the beat of the sperm tail, and, thereby, also the swimming path. If we compare the signaling

entlang des Eileiters zurücklegen. Fische und andere Meeresbewohner hingegen befruchten die Eizelle außerhalb des weiblichen Körpers. Seeigel etwa, der bekannteste Modellorganismus in der Spermienforschung, leben in Kolonien am Meeresboden und geben einmal im Jahr Eizellen und Spermien synchron ab. Im Wasser können sich die Spermien zwar frei in alle Richtungen bewegen. Es gibt aber auch unendlich viele Möglichkeiten das Ziel zu verfehlen. Je nachdem, ob es sich um Salz- oder Süßwasser oder den Eileiter handelt, unterscheidet sich das chemische Milieu erheblich. Trotz der unterschiedlichen Bedingungen gibt es jedoch eine gemeinsame Klammer für die meisten Befruchtungsvorgänge: Die Spermien werden durch chemische oder physikalische Signale zur Eizelle gelockt. Diese werden im Spermium in zelluläre bzw. elektrische Signale umgewandelt und beeinflussen so das Schwimmverhalten der Spermien. Handelt es sich bei den Reizen um chemische Substanzen, also Lockstoffmoleküle, die von der Eizelle oder ihrer Umgebung freigesetzt werden, spricht man von Chemotaxis. Andere bekannte Navigationssysteme für Spermien sind Rheotaxis (Orientierung an Flüssigkeits-Strömungen) und Thermotaxis (Orientierung an Temperaturunterschieden).

Die verschiedenen Anforderungen an die Spermien auf ihrer Suche nach der Eizelle führten im Laufe der Evolution zu unterschiedlichen Navigationsstrategien (Abbildung 1). Über die Navigation menschlicher Spermien ist wenig bekannt; dafür wird umso mehr spekuliert. Seeigel-Spermien hingegen kartographieren sehr genau die „chemische Landschaft“ eines Lockstoffs. Um ein solches chemisches Konzentrationsfeld auszulesen, hat sich ein Schwimmstil auf helikalen Bahnen als robuste Navigationsstrategie herausgebildet. Doch zeigen sich die unterschiedlichen Navigationsstrategien auch auf der Ebene der Signalerzeugung? Gibt es einen universellen biochemischen Signalweg, der von Tierart zu Tierart leicht variiert, oder unterscheiden sich die Signalwege grundlegend? Eines steht fest: Das „Ziel“ all dieser Signalwege ist, die Kalzium-Konzentration

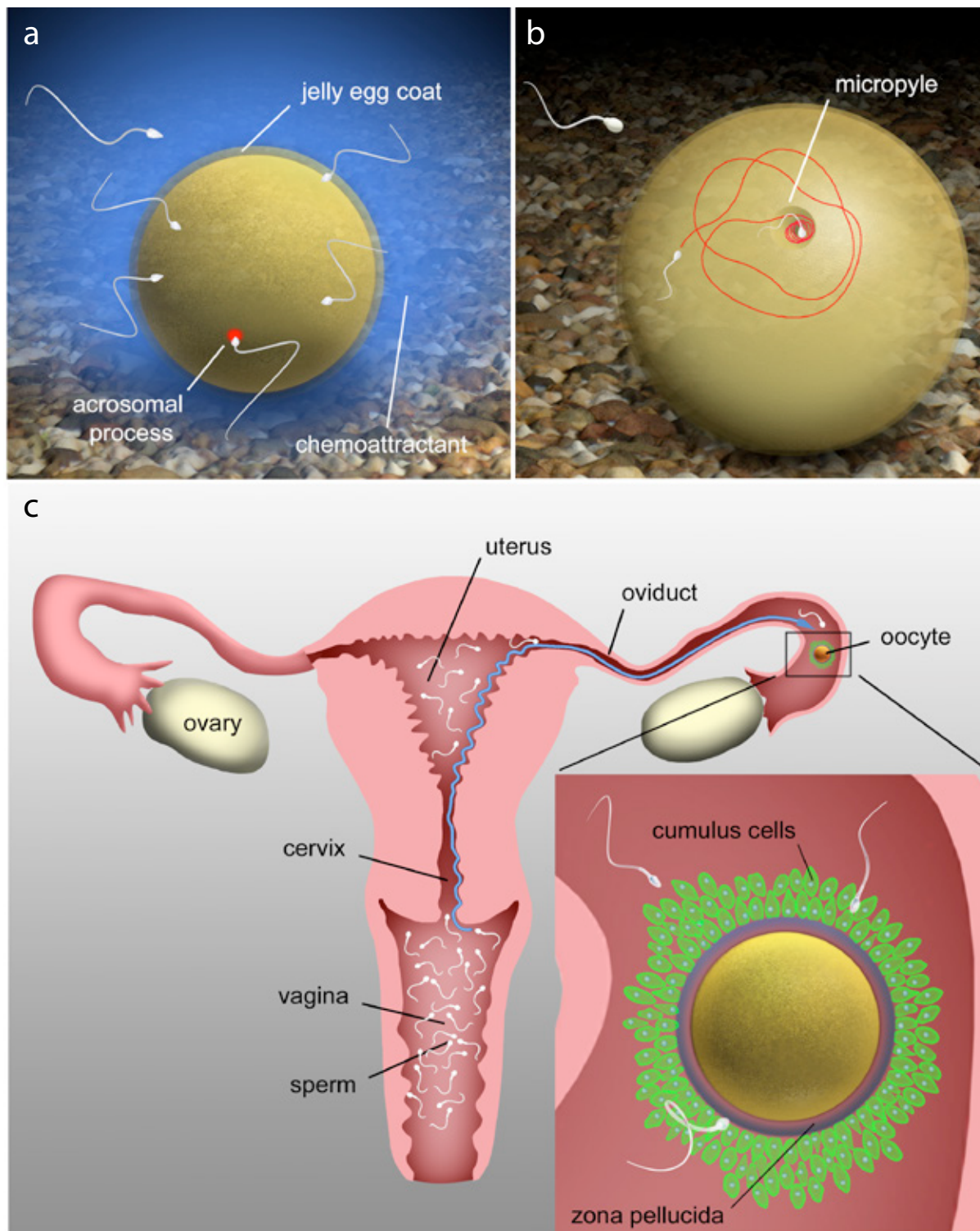


Figure 1. Navigation of sperm from sea urchins, zebrafish and humans. a. Sea urchins detect a chemoattractant that is released by the egg. This allows sea urchins to “map” their “chemical landscape”; they adjust their direction constantly and swim towards the egg along helical pathways. b. Zebrafish sperm have to find the micropyle, a small opening on the surface of the egg. They make their way bit by bit over the surface to reach this tiny pore. c. In humans, sperm probably reach the egg by rheotaxis. Which exact role is played by progesterone in this process remains a matter of speculation.

Abbildung 1. Die Navigation der Spermien von Seeigel, Zebrafisch und Mensch im Vergleich. a. Seeigel-Spermien registrieren einen chemischen Lockstoff, der von der Eizelle abgegeben wird. Die Spermien „kartografieren“ so die „chemische Landschaft“, passen ständig ihre Richtung an und schwimmen in helikalen Bahnen auf die Eizelle zu. b. Zebrafisch-Spermien müssen die Mikropyle finden, eine kleine Öffnung auf der Oberfläche der Eizelle. Sie hangeln sich an der Oberfläche entlang, um zu dieser kleinen Öffnung zu gelangen. c. Beim Menschen gelangen die Spermien wahrscheinlich durch Rheotaxis in die Nähe der Eizelle. Welche Rolle Progesteron dabei genau spielt, bleibt spekulativ.

pathways of different animal species, we encounter some real surprises.

Surprise no. 1: Sea urchin sperm possess an unusual potassium channel

The signaling pathway in the sea urchin *Arbacia punctulata* is well-documented and serves as a reference (Figure 2). To begin with, the egg releases a short-chain peptide as a chemoattractant. This attractant binds to a receptor located in the membrane of the sperm's tail (the flagellum) and stimulates production of a messenger substance (cGMP; cyclic guanosine monophosphate). In turn, the cGMP opens up a potassium-selective ion channel (CNGK; K^+ -selective cyclic nucleotide gated channel). Positively charged potassium ions escape from the cell, so that the cell's membrane potential becomes even more negative; this is referred to as hyperpolarization. This hyperpolarization activates a sodium/proton (Na^+/H^+) exchanger. The proton outflow alkalizes the cell, so that the pH increases. This alkalization contributes to the opening of a calcium ion channel, and Ca^{2+} ions flow into the cell. At the center of this signaling pathway is the CNGK channel. It is so extraordinary, that we devoted an article to it in the 2008 caesar Annual Report. The CNGK channel differs from all previously identified ion channels and represents a chimera which has "borrowed" properties and functional domains from several other ion channels. The channel possesses a binding site for cyclic nucleotides, so that it resembles the cyclic nucleotide-gated channels (CNG), which play an important role in the senses of vision and smell. However, the CNGK channel is made up of a long polypeptide chain, which consists of four similar channel domains, the so-called repeats. Elsewhere, this type of structure is only known to occur in sodium and calcium channels, but not in CNG channels. Another unusual feature is its extremely high ligand sensitivity: in the sea urchin, the CNGK channel opens at cGMP concentrations 1000 times lower than those required for other CNG channels. One cGMP molecule is enough to activate the channel. The reason for this is that only one of the four cyclic nucleotide-binding sites is

in der Zelle zu kontrollieren, denn die Kalzium-Konzentration steuert das Schlagmuster des Spermischwanzes und damit die Schwimmbahn. Vergleicht man die Signalwege unterschiedlicher Tierarten, stößt man auf einige echte Überraschungen!

Überraschung 1: Die Spermien von Seeigeln besitzen einen ungewöhnlichen Kaliumkanal

Der Signalweg beim Seeigel *Arbacia punctulata* ist gut beschrieben und dient als Referenz (Abbildung 2). Zunächst setzt die Eizelle ein kurzes Peptid als chemischen Lockstoff frei. Dieser Lockstoff bindet an einen Rezeptor in der Membran des Spermischwanzes und regt die Produktion eines Botenstoffes (cGMP; zyklisches Guanosinmonophosphat) an. Das cGMP wiederum öffnet einen Kalium-selektiven Ionenkanal (CNGK; K^+ -selective cyclic nucleotide gated channel). Positiv geladene Kaliumionen strömen aus der Zelle aus und deshalb wird die Spannung an der Zellmembran noch negativer; man spricht von Hyperpolarisation. Diese Hyperpolarisation aktiviert einen Natrium/Protonen- (Na^+/H^+)-Austauscher. Durch den Protonenausstrom alkalisiert die Zelle; der pH-Wert steigt also an. Die Alkalisierung trägt dazu bei, einen Kalziumkanal zu öffnen – Ca^{2+} -Ionen strömen in die Zelle. Im Mittelpunkt dieses Signalweges steht der CNGK-Kanal. Er ist so außergewöhnlich, dass wir ihm bereits im caesar-Jahresbericht 2008 einen eigenen Artikel gewidmet haben. Der CNGK-Kanal unterscheidet sich von allen bis dahin bekannten Ionenkanälen und stellt eine Chimäre dar, die sich bei anderen Ionenkanälen Eigenschaften und funktionelle Domänen „entliehen“ hat. Der Kanal besitzt eine Bindestelle für zyklische Nukleotide und ähnelt deshalb den zyklisch Nukleotid-gesteuerten Ionenkanälen (CNG; *cyclic nucleotide-gated channel*), die beim Sehen und Riechen eine wichtige Rolle spielen. Der CNGK-Kanal ist allerdings aus einer langen Polypeptidkette aufgebaut, die aus vier ähnlichen Kanaldomänen besteht, sogenannten *repeats*. Eine solche Architektur kennt man sonst nur von Natrium- und Kalziumkanälen, nicht aber von CNG-Kanälen. Ungewöhnlich ist zudem

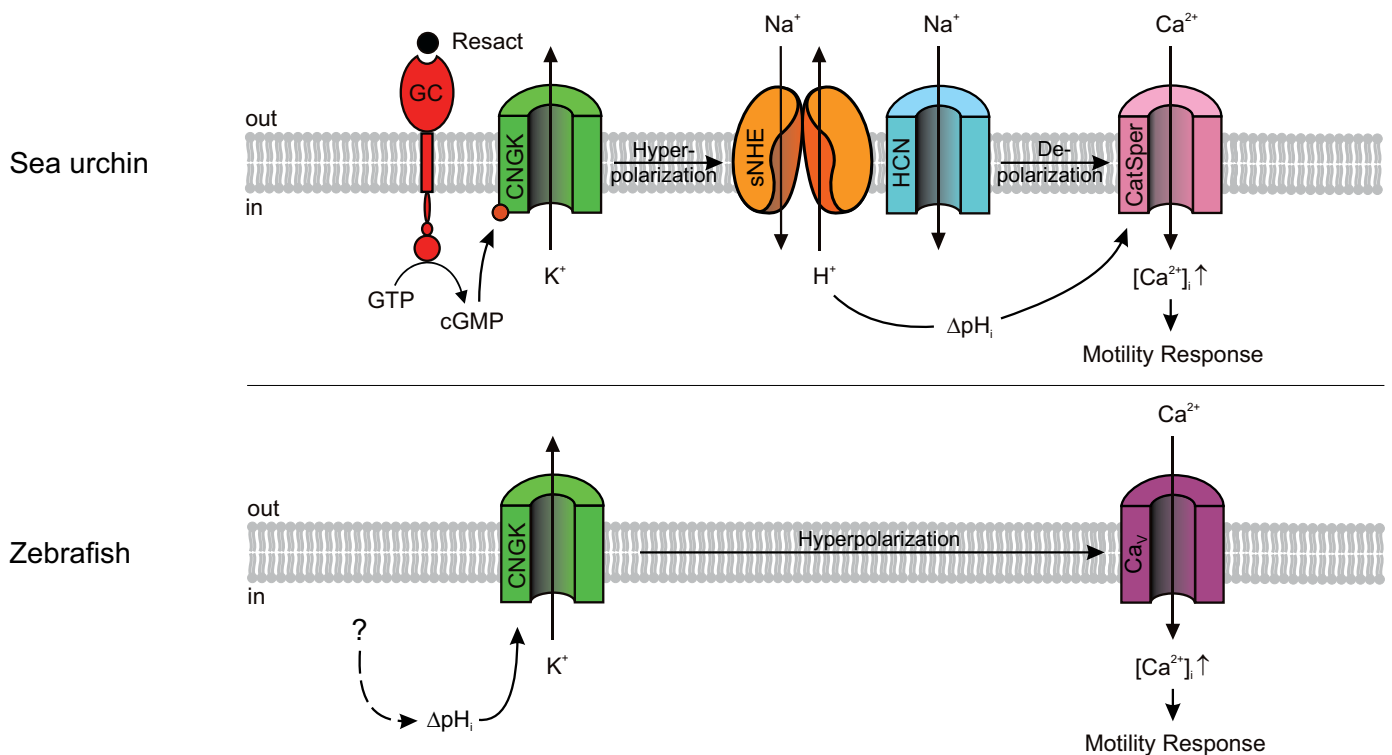


Figure 2. Models of signalling pathways in sea urchin and zebrafish sperm. **Sea urchin (upper panel):** Binding of the chemoattractant resact to a receptor guanylyl cyclase (GC) activates cGMP synthesis. Cyclic GMP opens K⁺-selective CNG channels (CNGK), thereby, causing a hyperpolarization, which in turn activates a sperm-specific Na⁺/H⁺ exchanger (sNHE) that alkalizes the cell. Alkalization and subsequent depolarization by hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated (HCN) channels lead to the opening of sperm-specific CatSper channels. **Zebrafish (lower panel):** Upon spawning, K⁺ efflux through CNGK hyperpolarizes sperm. An unknown mechanism of alkalization (dashed lines) modulates the open probability of CNGK channels; the ensuing hyperpolarization opens voltage-gated Ca²⁺ channels (Ca_v).

Abbildung 2. Modelle der Signalwege in den Spermien von Seeigel und Zebrafisch. **Seeigel (oben):** Bindet der Lockstoff Resact an die Guanlylyzyklase (GC), einen Rezeptor in der Spermienmembran, so wird cGMP im Inneren des Spermiums gebildet. Zyklisches GMP öffnet K⁺-selektive CNG-Kanäle (CNGK). Dadurch kommt es zu einer Hyperpolarisation, die ihrerseits einen spermien-spezifischen Na⁺/H⁺-Ionenaustauscher (sNHE) aktiviert und so die Zelle alkalisiert. Diese Alkalisierung und anschließende Depolarisation durch hyperpolarisations-aktivierte und zyklisch Nukleotid-gesteuerte Kanäle (HCN) öffnet spermien-spezifische CatSper-Kanäle. **Zebrafisch (unten):** Während des Ablaichens hyperpolarisiert das Spermium, da K⁺-Ionen durch den CNGK-Kanal des Spermiums ausströmen. Der CNGK-Kanal öffnet durch eine Alkalisierung der Zelle; der Mechanismus der Alkalisierung und der Öffnung sind bislang unbekannt. Die sich anschließende Hyperpolarisation öffnet unbekannte spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle (Ca_v).

functional, in contrast to the classic “cooperative” CNG channels, in which several sites need to be occupied to open the channel.

seine extrem hohe Liganden-Empfindlichkeit: Der CNGK-Kanal des Seeigels öffnet bereits bei 1000-fach geringeren cGMP-Konzentrationen als andere CNG-Kanäle: Ein cGMP-Molekül reicht aus, um den Kanal zu aktivieren. Dies liegt daran, dass nur eine einzige der vier Bindestellen für zyklische Nukleotide funktional ist, im Gegensatz zu klassischen, „kooperativen“ CNG-Kanälen, bei denen mehrere Stellen besetzt sein müssen, um den Kanal zu öffnen.



Surprise no. 2: Zebrafish have a similar potassium channel as sea urchins

This unusual CNGK channel is found in many marine invertebrates, and even in single-celled protista such as the choanoflagellates (*Salpingocea rosetta*); however, it had not been identified in vertebrates previously. For many years, therefore, it was assumed that CNGK channels occur exclusively in invertebrate animals. Thus, we were even more surprised to find a CNGK channel in the sperm of zebrafish and other fish as well. But how does the channel function in those species? Lots of surprises awaited us when we investigated this question.

Surprise no. 3: In zebrafish, the CNGK channel is located in the head of the sperm

All sperm signaling molecules which regulate the Ca^{2+} balance, thereby also regulating swimming behavior, are normally located in the tail. We then made an initially confusing observation in the sperm of zebrafish: the electrical currents through the CNGK channel were measured primarily in the head of the sperm. Using antibody methods, we were able to substantiate this observation. It was a truly unexpected discovery. What deeper significance could this have? The probable reason lies in navigation behavior: in contrast to sea urchin sperm, fish sperm are not attracted to the egg cell by chemical substances. After all, they don't need to be, as male fish deposit their sperm directly onto the surface of the egg. Instead, the sperm need to find the so-called *micropyle*, a tiny opening on the surface of the egg cell, with a diameter around 100 times smaller than that of the egg cell itself. When a sperm cell arrives at a site on the egg surface located some way from the micropyle, it needs to cross the large surface to get to this tiny opening. To investigate the navigation of zebrafish sperm in more detail, we dipped into our chemical "box of tricks" – as is so often the case – and used what are known as "caged calcium ions" (caged Ca^{2+}). The Ca^{2+} ions can be freed from their chemical "cages" with the aid of UV light. One advantage of this method is that reactions can be initiated "at

Überraschung 2: Zebrafische haben einen ähnlichen Kaliumkanal wie Seeigel

Diesen ungewöhnlichen CNGK-Kanal findet man bei vielen Wirbellosen im Meer, sogar bei einzelligen Protisten wie Kragengeißeltierchen (*Salpingocea rosetta*); jedoch wurde er bislang noch nie bei Wirbeltieren identifiziert. Man ging daher jahrelang davon aus, dass CNGK-Kanäle ausschließlich bei wirbellosen Tieren vorkommen. Umso überraschender war es, dass wir einen CNGK-Kanal auch in Spermien von Zebrafischen und anderen Fischen fanden. Doch wie funktioniert der Kanal dort? Bei der Aufklärung dieser Frage erlebten wir viele Überraschungen.

Überraschung 3: Der CNGK-Kanal befindet sich bei Zebrafischen im Kopf des Spermiums

Alle Signalmoleküle in Spermien, die den Ca^{2+} -Haushalt und damit das Schwimmverhalten kontrollieren, befinden sich normalerweise im Schwanz. Doch dann machten wir bei den Spermien von Zebrafischen eine verwirrende Beobachtung: Die elektrischen Ströme durch den CNGK-Kanal konnten vor allem im Kopf des Spermiums gemessen werden. Mit Antikörper-Methoden konnten wir diese Beobachtung erhärten. Eine wahrlich unerwartete Entdeckung! Welche tiefere Bedeutung könnte dies haben? Der Grund liegt wahrscheinlich im Navigationsverhalten begründet: Spermien von Fischen werden – im Gegensatz zu Seeigel-Spermien – nicht durch chemische Substanzen zur Eizelle gelockt. Das müssen sie auch gar nicht, denn die Spermien werden von den Fischmännchen direkt auf die Eioberfläche abgelegt. Stattdessen müssen die Spermien die sogenannte *Mikropyle* finden, eine kleine Öffnung auf der Oberfläche der Eizelle, die einen etwa 100mal kleineren Durchmesser besitzt als die Eizelle selbst. Wenn ein Spermium auf eine der *Mikropyle* abgewandten Seite der Eizelle ankommt, muss es die große Oberfläche durchqueren, damit es zu dieser kleinen Öffnung gelangt. Um das Navigationsverhalten von Zebrafisch-Spermien genauer zu untersuchen, haben wir – wie schon so

the touch of a button”, allowing the behavior of microscopically small swimmers to be recorded with a high degree of temporal and spatial resolution. This is an important step on the way to quantitative biology. Non-stimulated zebrafish sperm swim along a curved path, moving in wide arcs. Once the calcium is released by UV light, the curvature immediately increases. The arcs along which the sperm move become much narrower. A few of the cells are forced against the wall of the observation chamber and behave like power drills. They spin on the spot, as if trying to bore into the wall. Similar swimming behavior can also be seen in herring sperm. One function of the CNGK channel could be to control the rapid rotating movements of the head, which occur when the sperm is attempting to locate the egg cell’s micropyle and enter it. It is possible that the activity of the CNGK channel is regulated by haptic interaction between the sperm cell and molecules on the surface of the egg. This would explain why the CNGK channels are found primarily on the sperm head.

Surprise no. 4: The zebrafish CNGK channel is not activated by cyclic nucleotides, but by alkalization

The sea urchin CNGK channel is activated by cyclic guanosine monophosphate (cGMP), thus regulating the attractant-activated hyperpolarization of the cell. As these cGMP binding sites are conserved in the zebrafish, we might assume that the zebrafish CNGK is also activated by cyclic nucleotides. But this is way off the mark! In electrophysiological experiments, the channel could not be activated by cyclic nucleotides. So, how is the channel regulated? One hot candidate is the pH, since it controls many other biochemical signaling pathways in sperm, for example the potassium and calcium channels in mouse sperm. For this reason, we investigated whether the zebrafish CNGK channel is directly controlled by the intracellular pH. This was indeed the case. Whereas virtually no K^+ currents were measurable at pH 6.4, the K^+ current increased sharply at basic pH values. The CNGK channel in the zebrafish is thus a pH-dependent ion channel, which opens at alkaline pH. Therefore, the CNGK

häufig – in die chemische „Trickkiste“ gegriffen und „eingesperrte Kalziumionen“ (*caged-Ca²⁺*) verwendet. Diese können mit UV-Licht von ihrem chemischen „Käfig“ befreit werden. Ein Vorteil dieser Methode: Man kann Reaktionen „auf Knopfdruck“ starten und so Verhalten von mikroskopisch kleinen Schwimmern mit hoher zeitlicher und räumlicher Auflösung erfassen. Dies ist ein wichtiger Schritt in Richtung quantitative Biologie! Nicht-stimulierte Spermien von Zebrafischen schwimmen auf gekrümmten Bahnen in großen Bögen. Nach der Kalziumfreisetzung durch UV-Licht erhöht sich die Krümmung unmittelbar. Die Bögen, auf denen sich die Spermien bewegen, werden deutlich enger. Einige der Zellen werden gegen die Wand der Beobachtungskammer gedrückt und verhalten sich wie eine Bohrmaschine. Sie drehen sich auf der Stelle, als ob sie in die Wand eindringen wollten! Ein ähnliches Schwimmverhalten kann man auch bei Herings-Spermien beobachten. Eine Funktion des CNGK-Kanals könnte darin bestehen, die schnellen Drehbewegungen des Kopfes zu kontrollieren, beim Versuch des Spermiums, die *Mikropyle* der Eizelle zu finden und in sie einzudringen. Möglicherweise wird die Aktivität des CNGK-Kanals durch haptische Interaktion des Spermiums mit Molekülen auf der Eioberfläche kontrolliert. Dies würde erklären, warum sich die CNGK-Kanäle vor allem am Kopf des Spermiums befinden.

Überraschung 4: Der Zebrafisch-CNGK-Kanal wird nicht durch zyklische Nukleotide, sondern durch Alkalisierung aktiviert

Der Seeigel-CNGK-Kanal wird durch zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) aktiviert und steuert so die Lockstoff-aktivierte Hyperpolarisation der Zelle. Da diese cGMP-Bindestellen im Zebrafisch konserviert sind, sollte man davon ausgehen, dass auch der Zebrafisch-CNGK durch zyklische Nukleotide aktiviert wird. Doch weit gefehlt! In elektrophysiologischen Experimenten konnte der Kanal nicht durch zyklische Nukleotide aktiviert werden. Doch wodurch wird der Kanal dann gesteuert? Ein heißer Kandidat ist der pH-Wert, kontrolliert er doch viele andere biochemische



channels in zebrafish and sea urchins are differently activated. On the other hand, their physiological function remains the same: the hyperpolarization opens calcium channels and controls swimming behavior. But what does the calcium channel in the different species actually look like? In recent years, we have focused closely on these calcium channels, encountering some surprises there as well.

Surprise no. 5: The sperm of sea urchins and humans possess a similar CatSper calcium channel

Although human and sea urchin sperm harbour different signaling pathways, they still show similarities. In the sea urchin, hyperpolarization via the CNGK channel and the subsequent alkalization help to open a calcium channel. In human sperm, on the other hand, the Ca^{2+} influx is activated by prostaglandins and progesterone. Progesterone is a female sex hormone, produced in the vicinity of the egg. The opening of the calcium channel in human sperm is a very simple process - far simpler than has been believed for decades! A few years ago, all the complicated models that had been developed before had to be discarded. In the 2010 caesar Annual Report, we reported in detail about this discovery, which we had previously published in the renowned scientific journal *Nature*. But even though the signaling pathways in humans and sea urchins are so different, both cases involve a similar calcium channel, namely a CatSper channel. Yet another surprise! The channels themselves are also unusual. In humans, they are found exclusively in sperm, and there only in the membrane of the sperm's flagellum.

Surprise no. 6: Zebrafish sperm have a different calcium channel from those of sea urchins and humans

If sperm of two species as phylogenetically distant from one another as sea urchins and humans, both possess the CatSper channel, one might think that zebrafish also possess this channel. Once again, this is way off the mark! While our experimental studies have shown that calcium regulates the

Signalwege in Spermien, beispielsweise die Kalium- und Kalzium-Kanäle im Mausspermium. Wir untersuchten deshalb, ob der Zebrafisch-CNGK-Kanal durch den intrazellulären pH-Wert direkt kontrolliert wird. Dies war tatsächlich der Fall! Während bei einem pH-Wert von 6,4 praktisch keine K^{+} -Ströme gemessen werden können, steigt bei basischen pH-Werten der K^{+} -Strom stark an. Der CNGK-Kanal beim Zebrafisch ist also ein pH-abhängiger Ionenkanal, der im Alkalischen öffnet. Die CNGK-Kanäle bei Zebrafisch und Seeigel werden also unterschiedlich aktiviert. Die physiologische Funktion hingegen bleibt die gleiche: Die Hyperpolarisation öffnet Kalziumkanäle und kontrolliert das Schwimmverhalten. Doch wie sieht der Kalziumkanal bei den verschiedenen Arten eigentlich aus? In den letzten Jahren haben wir uns intensiv mit diesen Kalziumkanälen beschäftigt und sind auch dort auf Überraschungen gestoßen.

Überraschung 5: Die Spermien von Seeigel und Mensch besitzen einen ähnlichen CatSper-Kalziumkanal

Der Signalweg beim Spermium von Mensch und Seeigel ist unterschiedlich und doch ähnlich. Beim Seeigel trägt die Hyperpolarisation durch den CNGK-Kanal und die anschließende Alkalisierung dazu bei, einen Kalziumkanal zu öffnen. Bei menschlichen Spermien dagegen wird der Ca^{2+} -Einstrom durch Prostaglandine und Progesteron geöffnet. Progesteron ist ein weibliches Sexualhormon, das in der Nähe der Eizelle produziert wird. Die Öffnung des Kalziumkanals im menschlichen Spermium funktioniert sehr einfach, viel einfacher als man jahrzehntelang glaubte! All die komplizierten Modelle, die zuvor entwickelt wurden, mussten vor einigen Jahren über Bord geworfen werden. Im caesar-Jahresbericht 2010 haben wir ausführlich über diese Entdeckung berichtet, die wir zuvor in der renommierten Fachzeitschrift *Nature* veröffentlicht hatten. Aber obwohl die Signalwege bei Mensch und Seeigel so unterschiedlich sind, handelt es sich in beiden Fällen um einen ähnlichen Kalziumkanal, nämlich um einen CatSper-Kanal. Eine erneute Überraschung also! Auch die Kanäle

swimming behavior of zebrafish sperm, this must involve another calcium channel, which has not been identified so far. We can only speculate why a different calcium channel has evolved in this case. One thing is certain: over millions of years, the biochemical signaling pathways have adapted to the respective conditions to which sperm are exposed, such as their chemical environment. Zebrafish are freshwater fish. The concentrations of ions, such as sodium and potassium, are 500-1000 times lower in fresh water than in sea water. The CatSper channel is a depolarization-activated calcium channel, which means that it opens when the potential increases, i.e. when there is an influx of positive ions such as sodium. In an environment in which these ions are not available at sufficient concentrations, a CatSper channel simply cannot function properly.

We have seen so far that there is no single, universal biochemical signaling pathway in sperm. While the individual components of what may have been an ancient signaling pathway have been preserved across species that are phylogenetically far apart, these mechanisms have become highly differentiated over the course of evolution. The adaptations must surely be due to the different chemical environments in which sperm need to find their way. In sperm research, not everything is borne out as expected. Sperm are like grab bags – full of surprises. We can't wait to see what surprises still lay in store when the signaling pathways in the sperm of other animal species are studied.

selbst sind ungewöhnlich. Man findet sie beim Menschen ausschließlich in Spermien und dort auch nur in der Membran des Spermischwanzes.

Überraschung 6: Zebrafisch-Spermien haben einen anderen Kalziumkanal als Seeigel und Mensch

Wenn schon die Spermien zweier phylogenetisch so weit voneinander entfernter Arten wie Seeigel und Mensch den CatSper besitzen, dann sollten doch auch Zebrafische über diesen Kanal verfügen – sollte man meinen. Doch weit gefehlt! Zwar konnten wir experimentell zeigen, dass Kalzium das Schwimmverhalten der Zebrafisch-Spermien steuert, aber es muss sich dabei um einen anderen Kalziumkanal handeln, der bislang noch nicht identifiziert werden konnte. Warum sich hier evolutionär ein anderer Kalziumkanal entwickelt hat, darüber kann man nur spekulieren. Sicher ist: Die biochemischen Signalwege haben sich im Laufe der Millionen von Jahren an die Randbedingungen angepasst, denen die Spermien ausgesetzt sind, wie etwa das chemische Milieu. Zebrafische sind Süßwasserfische. Die Konzentration von Ionen wie Natrium und Kalium sind im Süßwasser 500-1000-fach geringer als im Salzwasser. Der CatSper-Kanal ist ein depolarisations-aktivierter Kalziumkanal, das heißt er öffnet sich, wenn sich die Spannung erhöht, also wenn positive Ionen wie Natrium einströmen. In einem Milieu, in dem diese Ionen nicht in ausreichender Konzentration vorhanden sind, kann ein CatSper-Kanal schlicht nicht gut funktionieren!

Wir haben also gesehen: Es gibt nicht „den“ universalen biochemischen Signalweg in Spermien. Zwar haben sich einzelne Bestandteile eines möglicherweise vorhandenen Ur-Signalweges über phylogenetisch weit entfernte Arten erhalten, doch haben sich die Mechanismen im Laufe der Evolution stark ausdifferenziert. Die Anpassungen sind sicher den unterschiedlichen chemischen Milieus geschuldet, in denen sich die Spermien orientieren müssen. In der Spermienforschung ist nicht immer alles so, wie man es vorher erwartet. Spermien sind



wie Wundertüten – voller Überraschungen. Man darf gespannt sein, welche Überraschungen uns noch erwarten, wenn die Signalwege in Spermien weiterer Tierarten untersucht werden.

Reference

[1] Fechner, S., Alvarez, L., Bönigk, W., Müller, A., Berger, T., Pascal, R., Trötschel, C., Poetsch, A., Stölting, G., Siegfried, K.R., Seifert, R. & Kaupp, U.B. (2015) "A K⁺-selective CNG channel orchestrates Ca²⁺ signalling in zebrafish sperm" *eLife*, e07624

Contact

Johannes Seelig

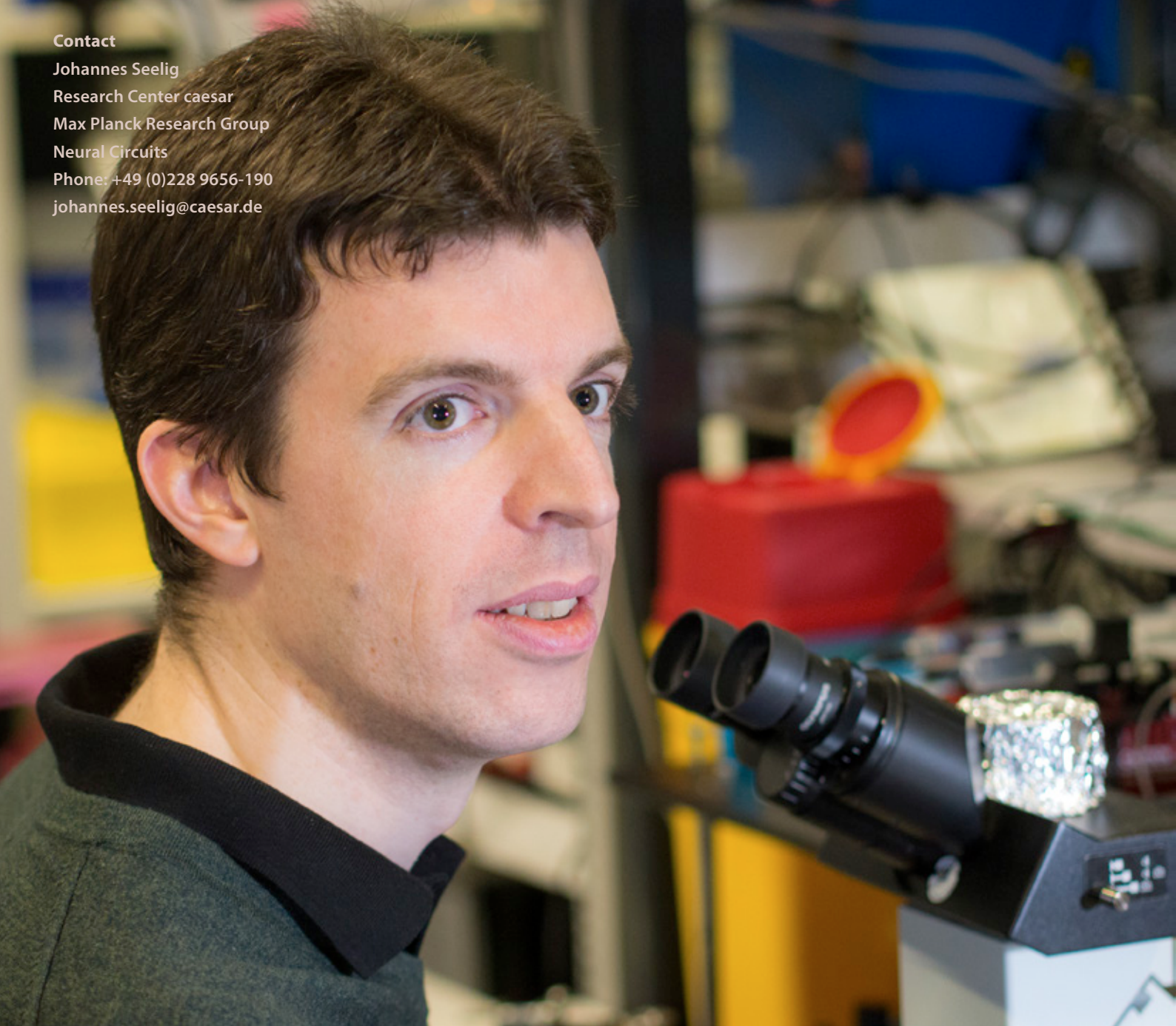
Research Center caesar

Max Planck Research Group

Neural Circuits

Phone: +49 (0)228 9656-190

johannes.seelig@caesar.de



Networks underlying the sense of direction

Johannes Seelig | Max Planck Research Group Neural Circuits

How do networks in the brain enable navigation and how do they control movements? Addressing these questions in the simple nervous system of the fruit fly indicates that basic network structures that are relevant for the mammalian brain contribute to navigation behavior in the fly. Thanks to the small size of the fly brain and the available genetic tools these networks can be

Ein Netzwerk für den Orientierungssinn

Wie bewegen wir uns im Raum und wie orientieren wir uns? Untersuchungen am einfachen Nervensystem der Fruchtfliege zeigen, dass hierbei neuronale Netzwerkstrukturen eine wichtige Rolle spielen, die auch für das Säugetiergehirn von Bedeutung sind. Dank der geringen Größe des Fliegengehirns und dank neuer genetischer Methoden können diese



analyzed in detail. Such experiments are expected to contribute to our understanding of how abstract computations are encoded in biological networks.

Sensorimotor integration

While we navigate the world our brain processes information about our environment and ourselves. Where are we, where are we going, are we still moving in the right direction? Additionally, our brain controls the movements of, for example, our legs or arms. Both, spatial information as well as information about our movements therefore enter the planning of our next moves. This combination of sensory and motor information is summarized under the name 'sensorimotor integration'.

We are far from understanding how this integration works and how these different signals are integrated in the brain. The difficulty stems from the fact that information processing in the brain runs in parallel in many cells and is distributed over many brain areas. For describing the neural circuits in the brain in detail, all these cells would need to be monitored simultaneously. As of today this is still an elusive goal, which is due to the large spread of individual cells together with the small dimensions of their subcellular structures.

The fruit fly as a model system

Every animal that navigates the world, for example for finding food, relies on the process of integrating sensory and motor signals. Sensorimotor integration can therefore also be studied in brains that are simpler than ours - such as the brain of the fruit fly. The fruit fly has only about 100'000 neurons compare with about 100'000'000'000 neurons in the human brain.

The fly brain is small and transparent enough to optically section it in its entirety with a two-photon microscope. Additionally, genetic methods allow us to subdivide the fly brain into small groups

Netzwerke in der Fruchtfliege im Detail untersucht werden. Von solchen Experimenten erhoffen sich die Forscher Erkenntnisse darüber, wie abstrakte mathematische Berechnungen in biologischen Netzwerken kodiert sind.

Sensomotorische Integration

Wenn wir uns im Raum bewegen werden in unserem Gehirn ständig Informationen verarbeitet – über unsere Umgebung und uns selbst: Wo befinden wir uns gerade? In welche Richtung gehen wir? Sind wir noch auf dem richtigen Weg? Zusätzlich werden unsere eigenen Bewegungen, etwa die unserer Beine oder Arme, kontinuierlich kontrolliert. Auf diese Weise fließen sowohl räumliche Informationen als auch Informationen über unseren momentanen Bewegungszustand in die Planung der nächsten Bewegungsabläufe ein. Diese Kombination von sensorischen und motorischen Informationen wird unter dem Begriff der „sensomotorischen Integration“ zusammengefasst.

Wir sind weit davon entfernt zu verstehen, wie diese Integration in unserem Gehirn im Detail abläuft und wie die verschiedenen Signale dort von den Netzwerken aus Nervenzellen verarbeitet werden. Dies hängt damit zusammen, dass die Informationsverarbeitung in vielen Zellen parallel abläuft – über mehrere Regionen des Gehirns verteilt. Um detaillierte Aussagen über die zellulären Schaltkreise machen zu können, müsste man idealerweise all diese Zellen gleichzeitig beobachten. Dies ist aber angesichts der großen Zahl und Ausdehnung der Zellen und gleichzeitig der kleinen Dimensionen der subzellulären Strukturen bis heute nur sehr eingeschränkt möglich.

Die Fliege als Modellsystem

Die erwähnten sensomotorischen Prozesse laufen in jedem Lebewesen ab, das sich im Raum bewegt und orientieren muss – etwa um Nahrung zu finden. Es bietet sich deshalb an, die sensomotorische Integration an einem einfachen Modellsystem zu untersuchen, etwa dem der Fruchtfliege.

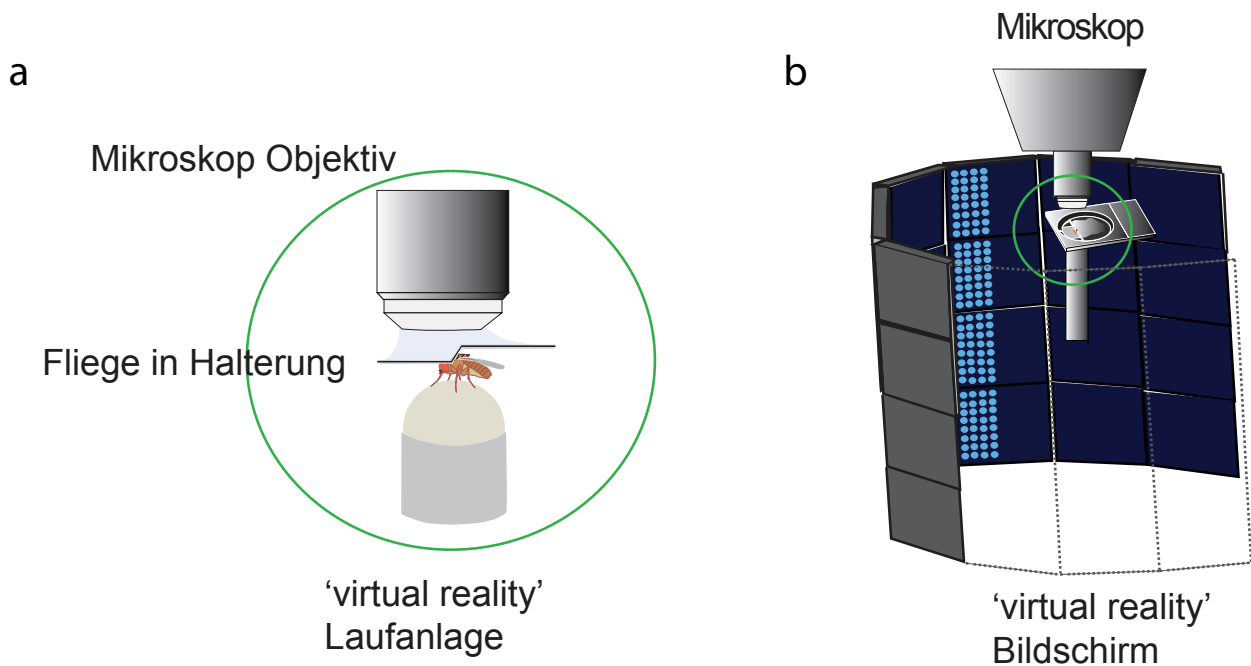


Figure 1. a. A fruit fly on a treadmill under the microscope objective. Walking activity as well as neural activity in the fly's brain are recorded at the same time. b. The fly is surrounded by a cylindrical display and navigates in a virtual reality. Adapted from [4].

Abbildung 1. a. Eine Fruchtfliege auf einer Laufanlage oder Tretmühle unter dem Mikroskopobjektiv. Sowohl die Laufbewegung der Fruchtfliege auf der Tretmühle als auch die Aktivität im Gehirn werden gleichzeitig gemessen. b. Die Fliege ist von einem zylindrischen Bildschirm umgeben und kann mit ihren Laufbewegungen in der auf dem Bildschirm gezeigten virtuellen Realität navigieren. Modifiziert nach [4].

of a few ten to a few hundred of neurons and there is an array of methods that can be applied to investigate these cells. Once a population of neurons has been characterized in detail, the analysis can continue with a second group that is connected to the first one. In this way, different elements of a larger circuit can be investigated and combined.

Einem Gehirn mit rund 100.000 Nervenzellen bei der Fruchtfliege stehen etwa 100.000.000.000 Nervenzellen beim Menschen gegenüber.

Die Beobachtung des Gehirns der Fruchtfliege wird dadurch erleichtert, dass sein Volumen klein genug ist, um es optisch mithilfe der Zweiphotonen-Mikroskopie vollständig zu durchdringen. Zusätzlich erlauben uns genetische Methoden, die Schaltkreise in kleinere Zellgruppen von einigen zehn oder hundert Zellen zu unterteilen. Diese Zellpopulationen lassen sich dann mit einer Vielfalt von Methoden untersuchen. Hat man eine Zellpopulation charakterisiert, kann man weitere Populationen finden, die mit der zuerst untersuchten in Verbindung stehen. So lassen sich die verschiedenen Elemente eines größeren Schaltkreises nach und nach zusammensetzen.

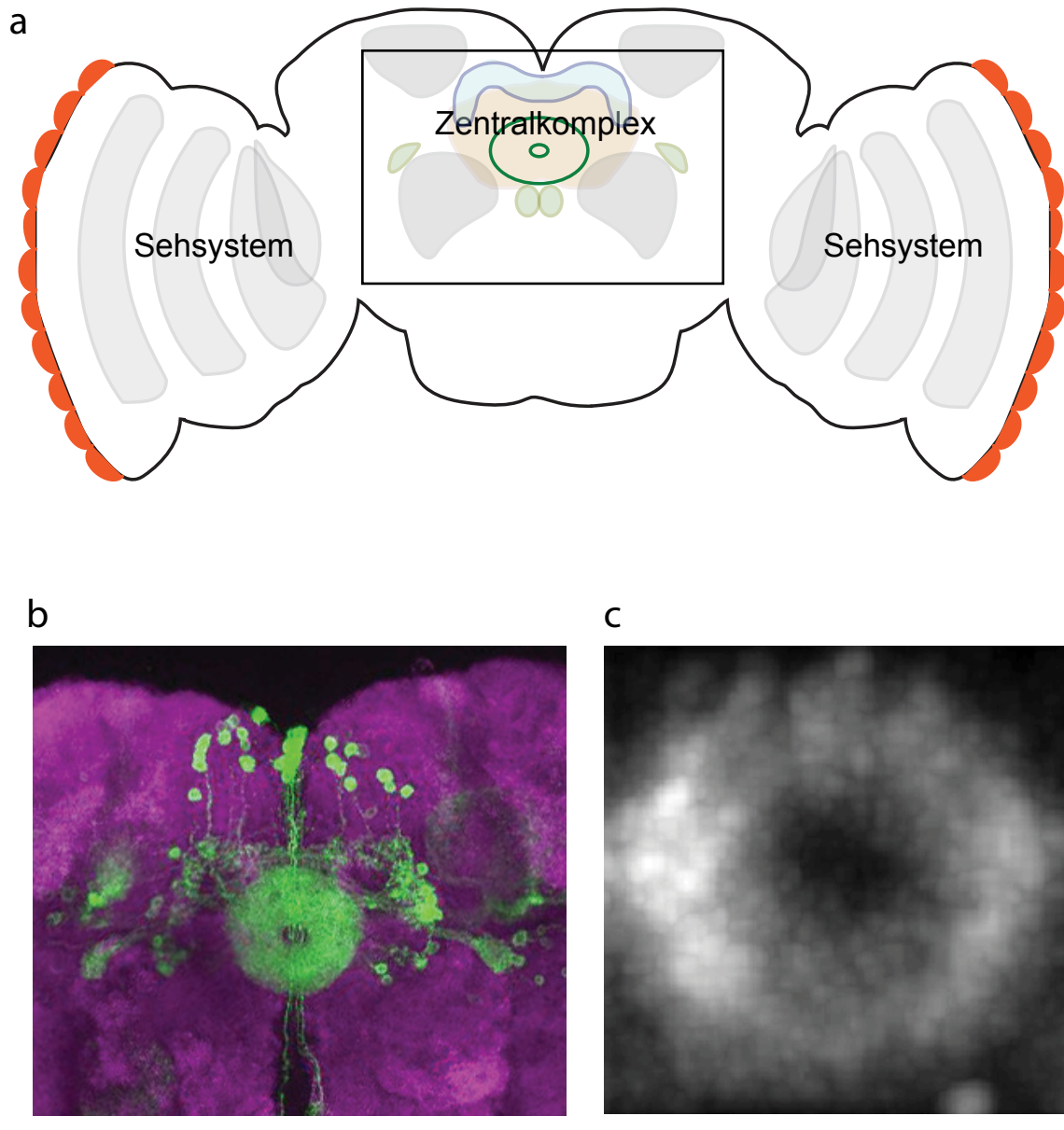


Figure 2. **a.** Schematic illustration of the fly brain with the visual system and the central complex, a structure in the center of the fly brain which is important for navigation. **b.** A group of about 30 genetically labeled cells (green) embedded in the center of the fly brain. **c.** Average over a recording of activity in the circularly arranged cells in the central complex. The scale bar is 20 μm . Adapted from [1].

Abbildung 2. **a.** Eine schematische Abbildung eines Schnitts durch das Fliegengehirn mit dem Sehsystem und dem Zentralkomplex, einer Struktur im Zentrum des Fliegengehirns, die auch für die Navigation wichtig ist. **b.** Eine Gruppe von ca. 30 Zellen (grün), die mit genetischen Mitteln markiert werden und in der Mitte des Fliegengehirns (violett) eingebettet liegen. **c.** Eine Mittelung einer Aktivitätsmessung in den ringförmig angeordneten Nervenzellen im Zentralkomplex. Der Maßstabsbalken beträgt 20 Mikrometer. Modifiziert nach [4].

Sensorimotor integration in the fly

Flies can indeed use vision to orient themselves, similar to ourselves, for example when we return to a parking spot where we left our car. Fruit flies were shown to be able to find a place again that they had visited earlier in the experiment, by orienting themselves using visual landmarks [1]. Even this relatively simple system therefore solves computational problems similar to those that

Sensomotorische Integration im Fliegengehirn

In Verhaltensexperimenten wurde gezeigt, dass sich Fliegen tatsächlich mithilfe des Sehsinns im Raum orientieren können, ähnlich wie wir dies tun, wenn wir z. B. zu einem Parkplatz zurückkehren, an dem wir unser Auto abgestellt haben [1]. Fruchtfliegen konnten in diesen Experimenten einen früher besuchten Ort wiederfinden, indem sie sich mithilfe ihres Sehsinns orientierten. Selbst dieses vergleichsweise einfache

are important for mammals. What are the neural networks that underlie this sense of direction in the fly? Scientists in Vivek Jayaraman's group at the Janelia Research Campus have developed methods for observing neural activity in the brain of fruit flies while they navigate in a virtual reality (Figure 1) [2]. These experiments revealed that a set of cells arranged in a circle (Figure 2) in the center of the fly's brain track the fly's own movement relative to objects in its surroundings (Figure 3) similar to a compass [3, 4]. This compass is updated even in darkness (in the absence of any visual stimulation) just based on the animals self motion. Neurons with similar properties had already been described in the rat brain [5] and many of the features of these so called head directions cells are now also found in *Drosophila*. Due to the large size and complexity of the circuits, the exact arrangement of these cells in the rat brain is unknown. However, mathematical models dating from the mid 1990's can describe many of the properties of these cells [6] and there are striking parallels between these models and the actual arrangement of the cells in the fly's brain. These abstract mathematical models originally developed for the rat brain therefore predict essential elements of a structure in the center of the fly brain. The fly seems to offer a compact and comprehensively accessible implementation of a network motif that is also highly relevant for the mammalian brain. As has been shown in much more detail for motion vision [7] or the olfactory system [8], the parallels between the fly brain and the mammalian brain are quite striking.

Nervensystem stellt also Berechnungen zur Lösung von Verhaltensaufgaben an, wie man sie auch bei Säugetieren antrifft. Was sind nun die neuronalen Netzwerke, die dieser räumlichen Orientierung zugrunde liegen? Wissenschaftler in der Gruppe von Vivek Jayaraman am Janelia Research Campus haben Methoden entwickelt, mit denen man die neuronale Aktivität im Gehirn von Fruchtfliegen beobachten kann, während sie sich in einer virtuellen Realität fortbewegen (Abbildung 1) [2]. Dadurch kann man das Navigationsverhalten der Fliege verfolgen, während gleichzeitig die Hirnaktivität mit einem Mikroskop beobachtet wird. In diesen Experimenten wurde gezeigt, dass in der Mitte des Fliegenhirns ringförmig angeordnete Zellgruppen (Abbildung 2) die Bewegungsrichtung der Fliege relativ zu Objekten der Umgebung verfolgen (Abbildung 3) – ähnlich einem Kompass [3, 4]. Und selbst im Dunkeln, wenn keine visuellen Reize auf das Auge treffen, wird der Kompass – nur durch die Verrechnung der Eigenbewegung – ständig neu justiert. Zellen mit ähnlicher Funktion sind bereits aus dem Rattengehirn unter dem Namen „Kopfrichtungszellen“ bekannt, und etliche Eigenschaften dieser Zellen finden sich in der Fruchtfliege wieder [5].

Die genaue Anordnung dieser Zellen im Gehirn von Ratten ist wegen der Größe und Komplexität der Schaltkreise nicht bekannt. Es wurden jedoch bereits Mitte der 1990er-Jahre mathematische Modelle vorgeschlagen, um die beobachteten Phänomene zu beschreiben [6]. Diese Modelle haben nun verblüffende Ähnlichkeiten mit der tatsächlichen Anordnung der Zellen im Fliegengehirn. Diese für das Rattengehirn entwickelten abstrakten Modelle sagen also wesentliche Elemente der Struktur einer zentralen Region des Fliegengehirns voraus. Es sieht so aus, als hätten wir in der Fliege eine kompakte, methodisch zugängliche Implementierung eines Netzwerkmotivs, das auch für das Säugetiergehirn von großem Interesse ist. Wie dies bereits für das Sehen von Bewegung [7] und für den Geruchssinn [8] in weit größerem Detail gezeigt wurde, gibt es also verblüffende Parallelen zwischen den Schaltkreisen im Gehirn der Fruchtfliege und denen im Gehirn der Säugetiere.

Outlook

For an in depth understanding of the brain we need to be able to link brain function to the underlying elementary neuronal components. How are abstract computations, such as those for the sense of direction, implemented in biological networks? To answer this question we need a detailed description of the biophysical and biochemical properties of the networks that implement these computations. This description encompasses for example the connections between the cells or the distribution of ion channels in the cell membrane. The small size of the fly brain and the advanced genetic tools facilitate such a detailed description. It is the goal of these experiments to find principles that apply beyond the specific organism and in this way contribute to our understanding of the human brain.

The author would like to thank Stefan Hartman for his editorial support.

Ausblick

Um zu einem tieferen Verständnis der Informationsverarbeitung im Gehirn zu gelangen, möchte man die Gehirnfunktionen auf die Eigenschaften der elementaren zellulären Bausteine zurückführen. Wie werden abstrakte mathematische Berechnungen, beispielsweise für den Orientierungssinn, in tatsächlichen biologischen Netzwerken implementiert? Um das zu verstehen, benötigen wir eine genaue Beschreibung der biophysikalischen und biochemischen Eigenschaften der Netzwerke, die einer bestimmten Funktion zugrunde liegen. Darunter fallen etwa die Verbindungen zwischen den Zellen oder die Verteilung der Ionenkanäle in der Zellmembran. Die geringe Größe des Gehirns der Fruchtfliege und die weit entwickelten genetischen Werkzeuge erleichtern eine solch detaillierte Beschreibung. Das Ziel dieser Experimente ist es, Gesetzmäßigkeiten zu beschreiben, die über die Grenze des spezifischen Organismus hinaus Gültigkeit haben und so zum Verständnis des menschlichen Gehirns beitragen.

Der Autor dankt Stefan Hartmann für die redaktionelle Unterstützung.

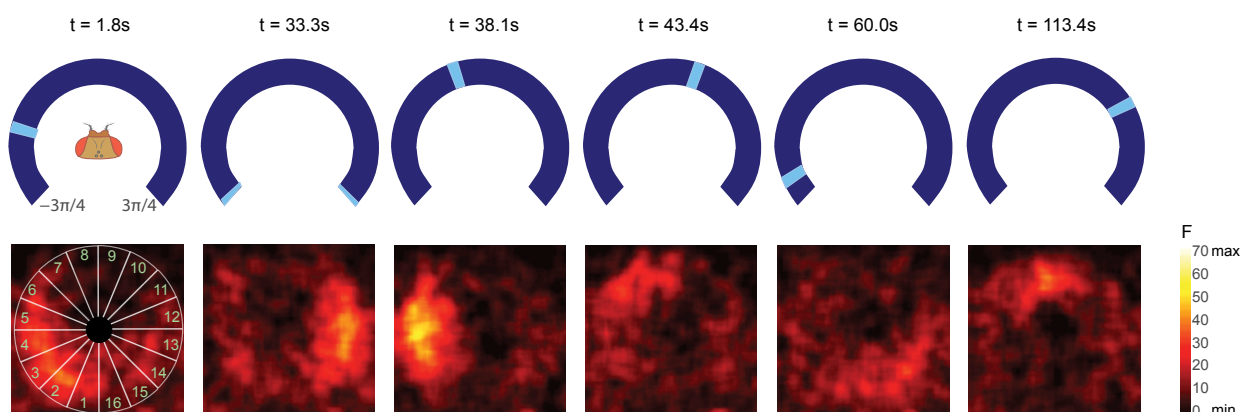


Figure 3. A subset of frames from a time series that show the position of a bar on the virtual reality arena together with the activity in the ring shaped cell population in the fly brain. In accord with the structure of the brain region the ring is subdivided in 16 wedges. The activity (F) on the ring moves together with the position of the bar on the arena. Adapted from [4].

Abbildung 3. Eine Auswahl aus einer Zeitreihe von Aufnahmen, die die Position eines Stabs auf dem Bildschirm und gleichzeitig die Aktivität in der ringförmigen Zellpopulation im Fliegengehirn zeigen (zu verschiedenen Zeitpunkten t im Experiment). Der Kompass wird entsprechend zum zellulären Aufbau in 16 Abschnitte unterteilt. Die Aktivität (F) im Ring dreht sich zusammen mit der Position des Stabs auf dem Bildschirm. Der Maßstabsbalken beträgt 20 Millimeter. Modifiziert nach [4].



References

- [1] Ofstad, T.A.; Zuker, C.S.; Reiser, M.B. (2011) "Visual place learning in *Drosophila melanogaster*" *Nature* 474, 204-207
- [2] Seelig, J.D.; Chiappe, M.E.; Lott, G.S.; Dutta, A.; Osborne, J.E.; Reiser, M.B.; Jayaraman, V. (2010) "Two-photon calcium imaging from head-fixed *Drosophila* during optomotor walking behavior" *Nature Methods* 7, 535-540
- [3] Seelig, J.D.; Jayaraman, V. (2013) "Feature detection and orientation tuning in the *Drosophila* central complex" *Nature* 503, 262-266
- [4] Seelig, J.D.; Jayaraman, V. (2015) "Neural dynamics for landmark orientation and angular path integration" *Nature* 521, 186-191
- [5] Taube, J.S. (2007) "The head direction signal: origins and sensory-motor integration" *Annual Review of Neuroscience* 30, 181-207 (2007)
- [6] Knierim, J.J.; Zhang, K. (2012) "Attractor dynamics of spatially correlated neural activity in the limbic system" *Annual Review of Neuroscience* 35, 267-285

Contact

Dagmar Wachten

Research Center caesar

Minerva Max Planck Research Group

Molecular Physiology

Phone: +49 (0)228 9656-311

dagmar.wachten@caesar.de



Molecular Physiology – from molecule to function

Dagmar Wachten | Minerva Max Planck Research Group Molecular Physiology

Our main research focus is to understand ciliary signaling and function. Cilia are membrane protrusions that come in two different flavors - they can be motile or immotile. Immotile cilia are called primary cilia. Motile cilia are found on the surface of epithelia cells for example in the brain (Figure 1). A special case of a motile cilium is the flagellum with the most prominent example being the sperm

Molekulare Physiologie – vom Molekül zur Funktion

Wir untersuchen in erster Linie ziliäre Signalwege und ihre Funktionen. Zilien sind Ausstülpungen der Zellmembran. Man unterscheidet bewegliche und unbewegliche Zilien; letztere werden auch primäre Zilien genannt. Bewegliche Zilien findet man auf der Oberfläche von Epithelzellen, etwa im Gehirn (Abbildung 1). Ein Spezialfall eines beweglichen Ziliums ist das Flagellum mit seinem wohl

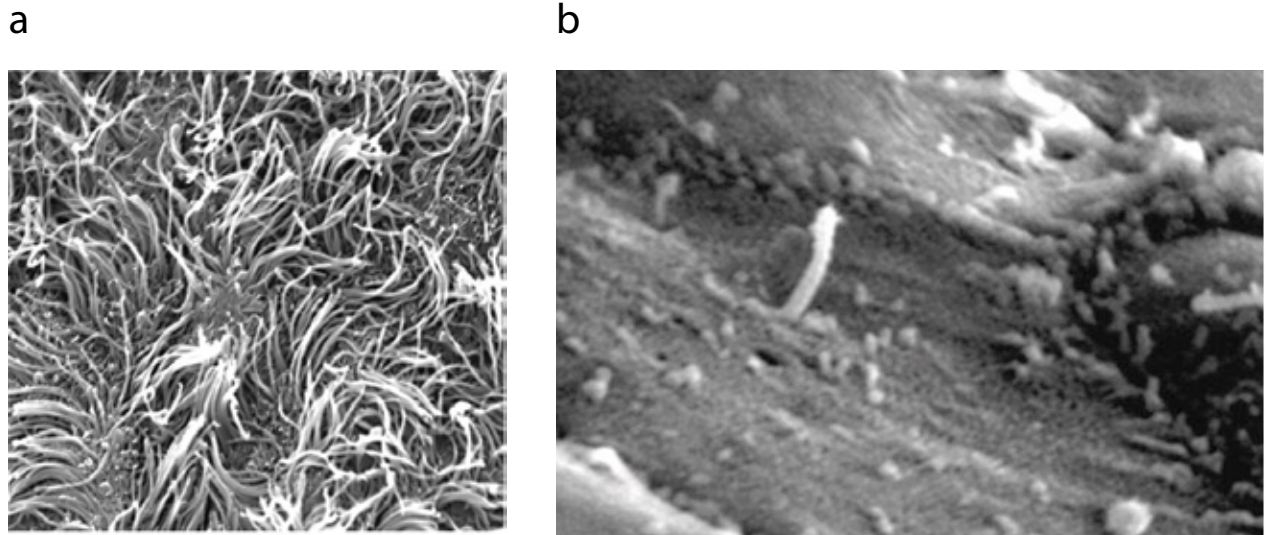


Figure 1. Scanning electron micrographic image of motile and immotile cilia. a. Motile cilia on the surface of ependymal cells located in the lateral ventricles of the brain. b. Primary cilium projecting from the surface of an ectodermal cell. Modified from Davenport & Yoder, 2005.

Abbildung 1. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von beweglichen und unbeweglichen Zilien. a. Bewegliche Zilien auf der Oberfläche von Ependymzellen. Diese Zellen kleiden das Ventrikelsystem des Gehirns und den Zentralkanal des Rückenmarks aus und sitzen vor allem in seitlichen (lateralen) Hirnventrikeln. b. Ein primäres Zilium auf der Oberfläche einer ektodermalen Zelle, also einer Zelle, die vom äußeren Keimblatt eines Embryoblasten abstammt. Abbildung modifiziert nach Davenport & Yoder, 2005.

flagellum. Both, cilia and flagella are subcellular compartments, which have been proposed to be functionally distinct from the cell soma. Ciliary signaling pathways, in particular in primary cilia, are ill-defined. Interestingly, almost every single cell in our body contains a primary cilium. Cilia control mechano-, chemo-, and photo-sensation, but also embryonic and neuronal development. However, their function in the adult state is largely unknown. In recent years, dysfunction of primary cilia has been correlated to a number of different diseases, which are commonly referred to as ciliopathies. They comprise e.g. polycystic kidney disease, blindness, or mental retardation. However, the underlying molecular mechanisms are rather enigmatic.

To unravel ciliary signaling pathways and their corresponding physiological function, we apply a multi-scale approach, including molecular biology, cell biology, biochemistry, and state-of-the-art imaging techniques. A major challenge is to analyze signaling in a tiny subcellular compartment independent from the rest of the cell. Our approach to tackle this problem is to use light for manipulating and analyzing signaling pathways for the following reason: 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

bekanntesten Beispiel, dem Spermenschwanz. Die Signalwege in Zilien, besonders in primären Zilien, sind bislang kaum verstanden. Und das, obwohl nahezu jede Zelle in unserem Körper ein primäres Zilium besitzt! Zilien kontrollieren neben mechanischer, chemischer und photonischer Sensorik auch die embryonale und neuronale Entwicklung. Ihre Funktion in adulten Zellen ist bislang weitgehend unbekannt. In den letzten Jahren wurden Fehlfunktionen von primären Zilien mit einer Vielzahl von Krankheiten in Verbindung gebracht, die als Ziliopathien bezeichnet werden. Dazu zählen etwa die Polyzystische Nierenerkrankung, Blindheit oder geistige Behinderung. Die molekularen Mechanismen dahinter jedoch blieben bislang rätselhaft.

Um die Signalwege und ihre physiologischen Funktionen zu entschlüsseln, verwenden wir einen vielfältigen Ansatz, der molekularbiologische, zellbiologische, biochemische und modernste bildgebende Methoden einschließt. Die große Herausforderung besteht darin, die Signalwege in einem winzigen Zellbereich zu analysieren, der unabhängig vom Rest der Zelle ist. Um dieses Problem zu lösen, verwenden wir Licht, und zwar aus folgendem Grund: Man muss die zellulären Signalwege mit hoher zeitlicher und räumlicher Präzision kontrollieren. Licht

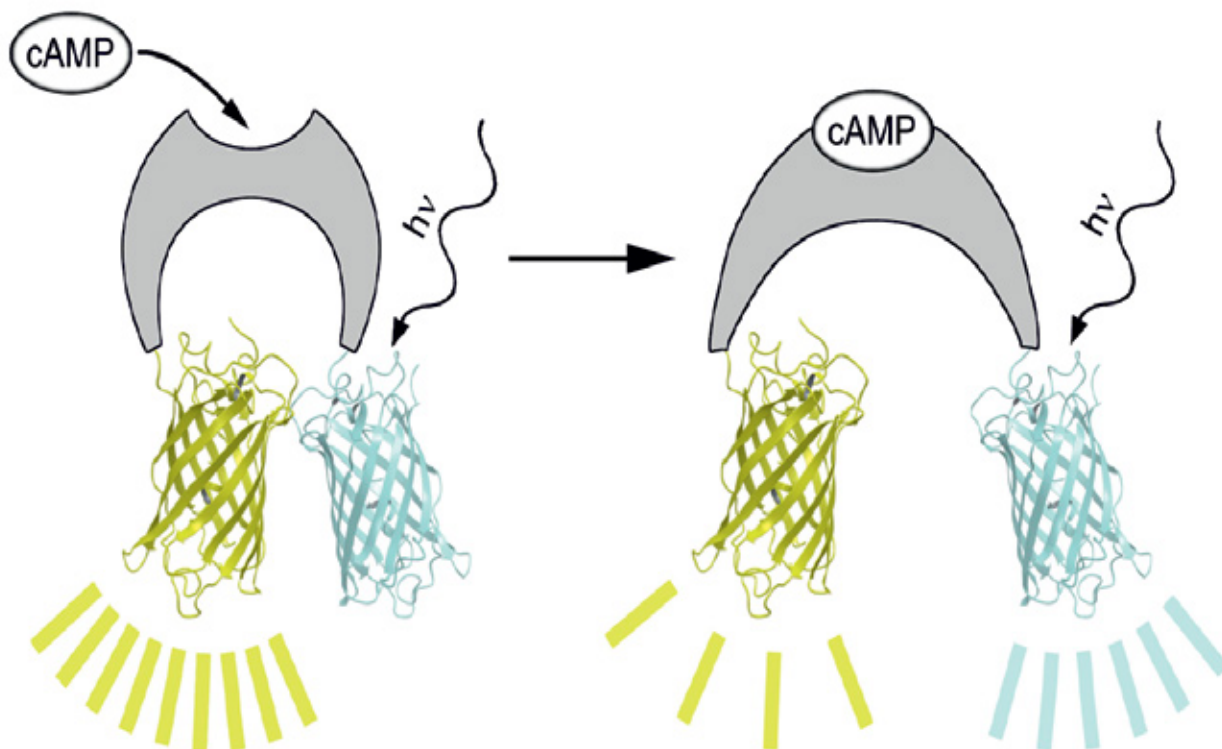


Figure 2. FRET-based cAMP biosensor. The sensor is based on conformational changes in the protein after binding of cAMP. FRET (Förster resonance energy transfer) is a mechanism describing energy transfer between two light-sensitive molecules. The amount of energy transfer depends on the distance and orientation between the two molecules.

Abbildung 2. FRET-basierter cAMP-Biosensor. Der Sensor beruht auf Konformationsänderungen im Protein nach der cAMP-Bindung. FRET (Förster resonance energy transfer) ist ein Mechanismus, der den Energietransfer zwischen zwei lichtempfindlichen Molekülen beschreibt. Der Energietransfer hängt vom Abstand und der Orientierung der beiden Moleküle ab.

switched on and off quickly, can be focused on very small spots within a cell, and does not affect other cellular processes. Cells are genetically modified to produce light-sensitive proteins and, thereby, can be controlled by light. This biological technique is called optogenetics. We apply a combination of optogenetics with genetically-encoded biosensors to manipulate and measure ciliary signaling with spatial and temporal resolution *in vitro* and *in vivo*.

Shedding light on sperm function

We first applied this approach to sperm flagella. Sperm mainly have to fulfil two functions: they need to swim to the egg and fertilize it. Both functions crucially rely on the second messenger cAMP. However, how cAMP controls signaling pathways in sperm is not well understood. Thus, we created two transgenic mouse lines – one expressing the blue light-activated adenylate cyclase (bPAC) and the other expressing our newly designed FRET-based cAMP biosensor exclusively in sperm (Figure 2).

eignet sich dafür ganz besonders gut, schließlich kann es schnell ein- und wieder ausgeschaltet werden, gezielt fokussiert werden und stört vor allem keine anderen zellulären Prozesse. Um lichtempfindliche Proteine herzustellen, werden Zellen gentechnisch verändert. So können Zellfunktionen mit Licht kontrolliert werden. Diese biologische Technik nennt man Optogenetik. Um die ziliären Signalwege *in vitro* und *in vivo* hochaufgelöst messen zu können, verwenden wir Biosensoren.

Ein Lichtschalter für Spermien

Unsere soeben beschriebenen Techniken haben wir zunächst am Flagellum von Spermien angewendet. Spermien müssen zur Eizelle schwimmen und diese befruchten. Beide Funktionen gehen auf den sekundären Botenstoff cAMP zurück. Wie genau cAMP die zugrundeliegenden Signalwege steuert, ist jedoch bislang nicht gut verstanden. Daher haben wir zwei transgene Mauslinien gezüchtet: Die eine Linie exprimiert eine lichtakti-

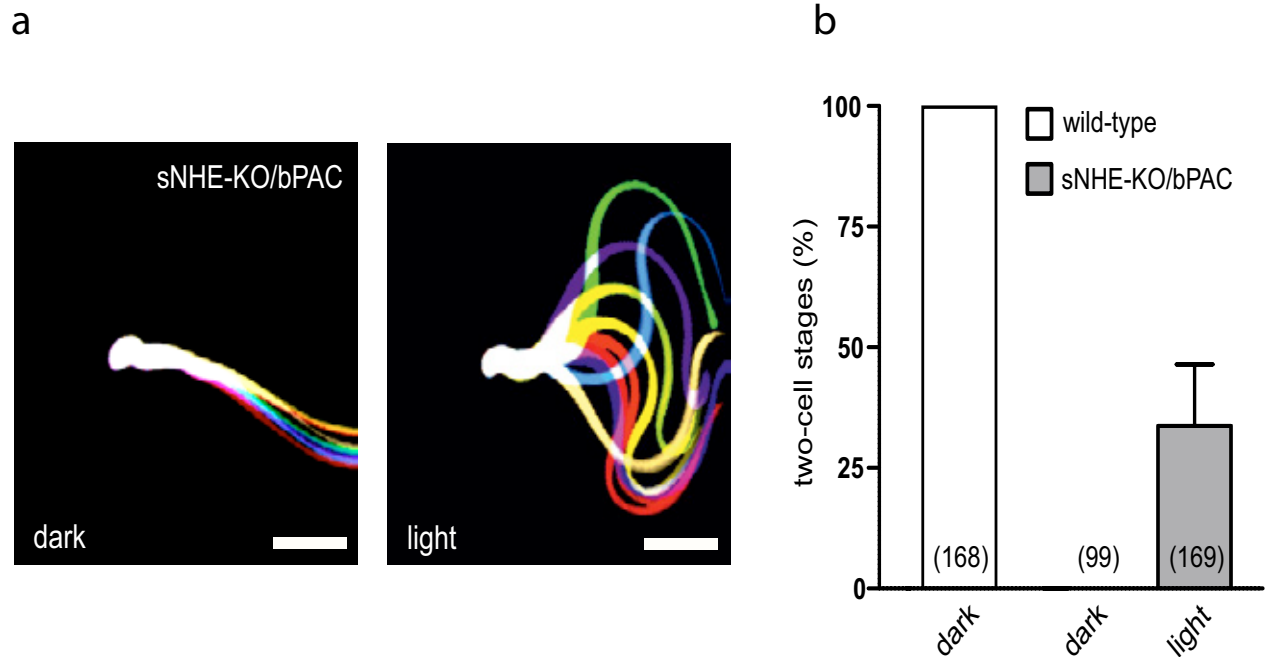


Figure 3. a. In the knockout mouse model *sNHE-KO*, cAMP synthesis is abolished. The sperm are unable to move; therefore the *sNHE-KO* males are infertile. bPAC is a photo-activated adenylate cyclase that synthesizes cAMP. To restore the motility in *sNHE-KO* sperm by light, *sNHE-KO* mice are crossed with bPAC mice. The resulting *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*.

Abbildung 3. a. In den Spermien der *sNHE-KO*-Männchen findet keine cAMP-Synthese statt. Die Spermien zeigen keine Vorwärtsbewegung; die *sNHE-KO*-Männchen sind unfruchtbar. bPAC ist eine lichtaktivierbare Adenylatzyklase, die den Botenstoff cAMP synthetisiert. Um die Motilität der *sNHE-KO*-Spermien durch Licht wieder in Gang zu bringen, werden *sNHE-KO*-Mäuse mit bPAC-Mäusen gekreuzt. Im Dunkeln sind die Spermien dieser doppelt-transgenen *sNHE-KO/bPAC*-Mäuse 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*.

FRET (*Förster resonance energy transfer*) is a mechanism describing energy transfer between two light-sensitive molecules. In our biosensor, the amount of energy transfer depends on the distance and orientation between two fluorophores. Upon binding to cAMP, a structural rearrangement leads to less energy transfer.

This allowed manipulating and measuring cAMP signaling in sperm, respectively. Using the bPAC transgenic mice, we were able to control sperm motility and fertilization by light. We could show that the increase in cAMP levels is directly correlated with an increase in flagellar beat frequency. When stimulated with blue light, cAMP levels in bPAC sperm increased and in turn, the flagellar beat frequency also increased and the sperm were swimming faster [1]. Furthermore, light stimulation restored motility in bPAC sperm that lack the endogenous enzyme for cAMP production and that are immotile in the dark due to the lack of cAMP. However, light stimulation did not only restore

vierbare Adenylatzyklase (bPAC), die andere unseren neuentworfenen cAMP-Sensor, der auf der FRET-Technik beruht. Mit FRET (*Förster resonance energy transfer*) kann man den Energietransfer zwischen zwei lichtempfindlichen Molekülen messen. Bei unserem Biosensor hängt der Energietransfer vom Abstand und der Orientierung zweier Fluorophore ab. Nach der Bindung von cAMP verringert sich, aufgrund von Konformationsänderungen, die übertragende Energie zwischen den Fluorophoren.

Diese Techniken erlauben es, cAMP-gesteuerte Signalwege in Spermien sowohl zu manipulieren als auch zu messen. Bei der bPAC-transgenen Maus konnten wir Motilität und Fruchtbarkeit mit Licht steuern. Stimuliert man diese Spermien mit blauem Licht, so steigt die cAMP-Konzentration an, das Flagellum schlägt mit höherer Frequenz und die Spermien schwimmen schneller [1]. Durch Stimulation mit Licht konnten sogar Spermien zum Schwimmen gebracht werden, denen das natürliche

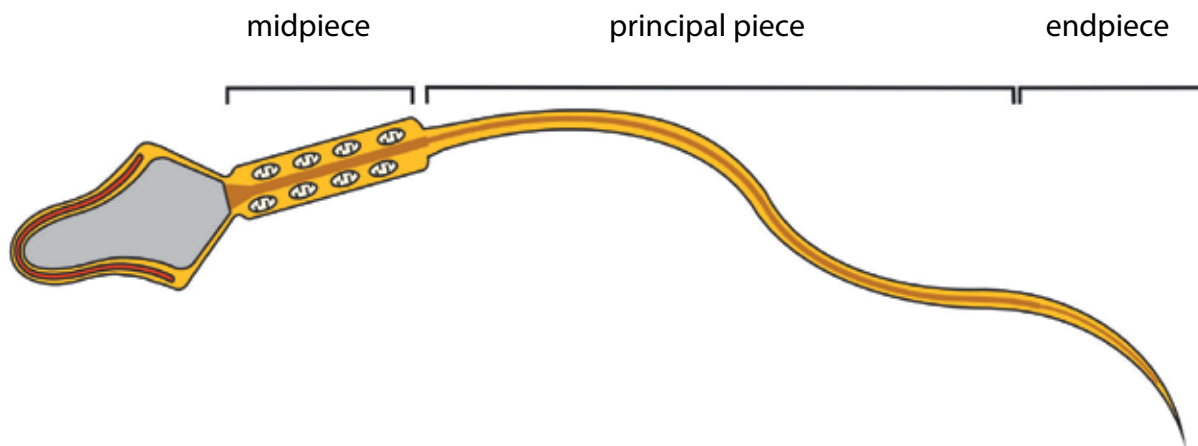


Figure 4. Overview sperm morphology. The sperm flagellum is divided into three major parts: the midpiece, the principal piece, and the endpiece.

Abbildung 4. Überblick über die Spermienmorphologie. Ein Flagellum eines Spermiums ist in drei Abschnitte geteilt: das Mittelstück, das Hauptstück und das Endstück.

motility, it also restored fertility in these mice, as we could show using an *in vitro* fertilization approach [1; Figure 2]. Thus, bPAC proofed to be a powerful tool to study cAMP signaling in sperm flagella.

Our newly designed FRET-based cAMP biosensor allows to measure changes in cAMP levels in the nanomolar range. Thereby, the sensor was perfectly suited to study cAMP signaling in sperm flagella. Sperm flagella are morphologically and functionally organized in different compartments: the midpiece, the principal piece, and the endpiece (Figure 4).

We could show that cAMP signaling is not uniform along the sperm flagellum, but rather compartmentalized, providing a molecular basis for the functional difference between e.g. the midpiece and principal piece [2].

From motile to primary cilia

We have successfully applied the combination of optogenetics with genetically-encoded biosensors to manipulate and analyze cAMP signaling in sperm flagella. We now want to bring this approach to the next step and apply it to primary cilia. So far, cAMP signaling in primary cilia is only ill-defined. Dysfunction of cAMP signaling has

Enzym zur Produktion von cAMP fehlt und die im Dunkeln unbeweglich sind. Die Stimulation mit Licht stellte nicht nur die Motilität der Spermien wieder her, sondern auch ihre Fruchtbarkeit, wie wir *in vitro* nachweisen konnten [1; Abbildung 2]. Somit hat sich bPAC als sehr mächtiges Werkzeug erwiesen, um cAMP-Signalwege im Spermienflagellum zu untersuchen.

Der neue FRET-basierte cAMP-Biosensor erlaubt es, Änderungen der cAMP-Konzentration selbst im nanomolaren Maßstab zu messen. Daher erwies er sich als ideal, um cAMP-Signalwege im Flagellum von Spermien zu untersuchen. Ein solches Flagellum ist strukturell und funktional in drei Abschnitte geteilt: das Mittelstück, das Hauptstück und das Endstück (Abbildung 4).

Wir konnten zeigen, dass sich die cAMP-gesteuerten Signalwege nicht gleichmäßig über das Flagellum erstrecken. Stattdessen gibt es funktionale Unterschiede, beispielsweise zwischen Mittel- und Hauptstück [2].

Von beweglichen zu primären Zilien

Wir möchten unsere erfolgreich an Spermien erprobte Technik – der kombinierte Einsatz von Optogenetik und Biosensoren – nun auch auf primäre Zilien übertragen.

been correlated with the occurrence of ciliopathies. It has been proposed that cAMP is crucial for transducing external stimuli, impinging on the surface of the primary cilia, into an intracellular response. In this model, the primary cilium creates a unique cAMP signaling domain, independent of the rest of the cell. However, experimental evidence for this model is lacking. We will test this model by applying our tools to the primary cilium and, thereby, manipulate and analyze cAMP signaling solely in the primary cilium, independent of the rest of the cell.

This approach will allow to answer:

- 1) How do primary cilia act as environmental sensors transducing external stimuli into a cellular response?
- 2) Are primary cilia a cellular "tool" to allow cell-cell communication in the adult state and, thereby, control physiological functions?
- 3) How does ciliary dysfunction lead to the development of severe diseases that are commonly referred to as ciliopathies?

Off note, our approach is not restricted to ciliary signaling and function, but can be applied to any subcellular compartment, where signaling needs to be studied with high spatial and temporal resolution. Thereby, this approach will contribute to answering the fundamental biological question: How do subcellular compartments control cellular function, tissue function, and finally, the function of whole organisms?

Bislang sind die cAMP-Signalwege in primären Zilien kaum erforscht. Fehlfunktionen innerhalb dieser Signalwege werden mit dem Auftreten von Ziliopathien in Verbindung gebracht. Es wurde vorgeschlagen, dass cAMP eine wichtige Rolle spielt, wenn externe Reize, die auf der Zilienoberfläche eintreffen, in intrazelluläre Antworten umgewandelt werden. In diesem Modell wird das primäre Zilium als alleiniger Ort der cAMP-Signalwege betrachtet, der unabhängig vom Rest der Zelle ist. Dafür fehlen allerdings bislang jegliche experimentelle Beweise. Wir planen, dieses Modell mithilfe unserer Techniken zu überprüfen und die cAMP-Signalwege im primären Zilium zu manipulieren und zu analysieren, unabhängig vom Rest der Zelle.

Dabei möchten wir folgende Fragen beantworten:

- 1) Wie übersetzen primäre Zilien als Umgebungs-sensoren Reize von außen in zelluläre Antworten?
- 2) Sind primäre Zilien ein "Werkzeug", um Kommunikation zwischen adulten Zellen zu ermöglichen und physiologische Funktionen zu kontrollieren?
- 3) Wie führen ziliäre Fehlfunktionen zu schweren Krankheiten, die unter dem Begriff Ziliopathien zusammengefasst werden?

Unser Ansatz ist nicht auf ziliäre Signalwege und Funktionen beschränkt, sondern kann auch auf andere subzelluläre Einheiten angewendet werden, deren Signalwege mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung untersucht werden müssen. Dieser Ansatz wird dazu beitragen, eine der grundlegenden biologischen Fragen zu beantworten: Wie kontrollieren subzelluläre Einheiten die Funktion der Zelle, des Gewebes oder gar des ganzen Organismus?

References

- [1] Jansen, V., Alvarez, L., Balbach, M., Strünker, T., Hegemann, P., Kaupp, U.B. & Wachten, D. (2015) "Controlling fertilization and cAMP signaling in sperm by optogenetics" *eLife* 4, e05161
- [2] Mukherjee, S., Jansen, V., Jikeli, J. F., Hamzeh, H., Alvarez, L., Dombrowski, M., Balbach, M., Strünker, T., Seifert, R., Kaupp U. B. & Wachten, D. (2016) "A novel biosensor to study cAMP dynamics in cilia and flagella", *eLife*, DOI: <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.14052>

Contact

Elmar Behrmann

Research Center caesar

Freigeist Research Group

Structural Dynamics of Proteins

Phone: +49 (0)228 9656-268

elmar.behrmann@caesar.de



Nano-scaffolds for membrane proteins – a made-to-measure environment for electron microscopy

Nanogerüste für Membranproteine – eine maßgeschneiderte Umgebung für die Elektronenmikroskopie

Elmar Behrmann | Freigeist Research Group Structural Dynamics of Proteins

We require high-resolution electron microscopy images to better understand the structural dynamics of proteins. For this, we need to first isolate the proteins we are interested in. This requires removing them from their natural surroundings, and placing them into an artificial environment, potentially affecting their activity. In order to mitigate these effects, and to allow

Um die strukturelle Dynamik von Proteinen verstehen zu können, benötigen wir hoch-aufgelöste elektronenmikroskopische Bilder. Hierfür müssen die Proteine jedoch zuerst isoliert werden. Dabei entfernen wir die Proteine aus ihrer natürlichen Umgebung, wodurch ihre Aktivität beeinflusst werden kann. Um diese Effekte zu minimieren und Proteine im Elektronenmikroskop

us to image proteins in an as-natural-as-possible setting, we are creating tailor-made nano-scaffolds. Our research is funded by the Freigeist program of the VolkswagenFoundation as well as by caesar.

Genes are the “blueprints” of our proteins, and about 30% of them act as plans for proteins that reside in the membrane of a cell. These so-called membrane proteins are responsible for transport processes across membranes, and are thus vital for a cell's survival. Moreover, they play an important role in signal reception, and thus also in communication processes. In the light of these key functions it comes at no surprise that membrane proteins – more specifically their malfunction – are the cause of many diseases.

Compared with soluble proteins we know much less about the structures of membrane proteins – and barely anything about the structural dynamics underlying their activity (see our yearly report 2014). There are two reasons for this: Firstly, despite the fact that our genes contain the blueprints for many different membrane proteins, they are not abundant but in most cases rather rare. Secondly, they are not soluble and thus isolating them is much more demanding.

Detergents are the current default when working with membrane proteins. They dissolve the membrane, and keep individual membrane proteins in solution. It is however known that detergents can have a negative influence on both protein activity as well as stability. Likely, this is due to the different chemical environment presented compared with native membrane lipids. Like a human behaving differently in a free park than in a rush-hour underground station, proteins and their dynamics are influenced by their environment. Thus, in order to understand the functional effects of structural dynamics, we need to mimic their natural environment as closely as possible. In the following we will present two alternatives to detergents that can offer a tailor-made environment for membrane proteins.

in einer naturgetreuen Umgebung abbilden zu können, schaffen wir maßgeschneiderte Nanogerüste. Unsere Forschung wird unterstützt durch das Freigeist-Programm der Volkswagen-Stiftung sowie durch caesar.

Gene sind die „Bauanleitungen“ unserer Proteine. Circa 30% der menschlichen Gene sind Pläne für Proteine, die direkt in den Membranen von Zellen sitzen. Da diese sogenannten Membranproteine verantwortlich für den Stofftransport über Membranen sind, ist ihre Funktion für das „Wohlergehen“ der Zelle entscheidend. Zudem spielen sie eine entscheidende Rolle bei der Wahrnehmung von externen Reizen und ermöglichen so auch die Kommunikation mit anderen Zellen. Angesichts dieser Schlüsselfunktionen ist es wenig verwunderlich, dass Membranproteine – genauer: ihre Fehlfunktion – die Ursache für viele Erkrankungen sind.

Im Vergleich zu löslichen Proteinen wissen wir noch relativ wenig über die Strukturen von Membranproteinen – und fast nichts über die ihrer Aktivität zugrunde liegende strukturelle Dynamik (vgl. Jahresbericht 2014). Dies hat zwei Gründe: Obwohl unsere Gene Anleitungen für sehr viele unterschiedliche Membranproteine enthalten, sind sie nur in geringer Stückzahl vorhanden. Zum anderen sind Membranproteine nicht löslich und somit nur schwer zu isolieren.

Seifen sind derzeit das Standardmittel für die Arbeit mit Membranproteinen. Sie lösen die Membran auf und können einzelne Membranproteine in Lösung halten. Jedoch ist bekannt, dass Seifen auch einen schädlichen Einfluss auf die Proteinaktivität und –stabilität haben können. Wahrscheinlich liegt das daran, dass sie chemisch eine andere Umgebung als die natürlichen Membran-Lipide darstellen. Ähnlich wie ein Mensch, der sich in einer U-Bahn-Station zur Stoßzeit anders verhält als auf einer freien Wiese, wird auch die Bewegung von Proteinen von ihrer Umgebung beeinflusst. Wenn wir die strukturelle Dynamik von Membranproteinen untersuchen

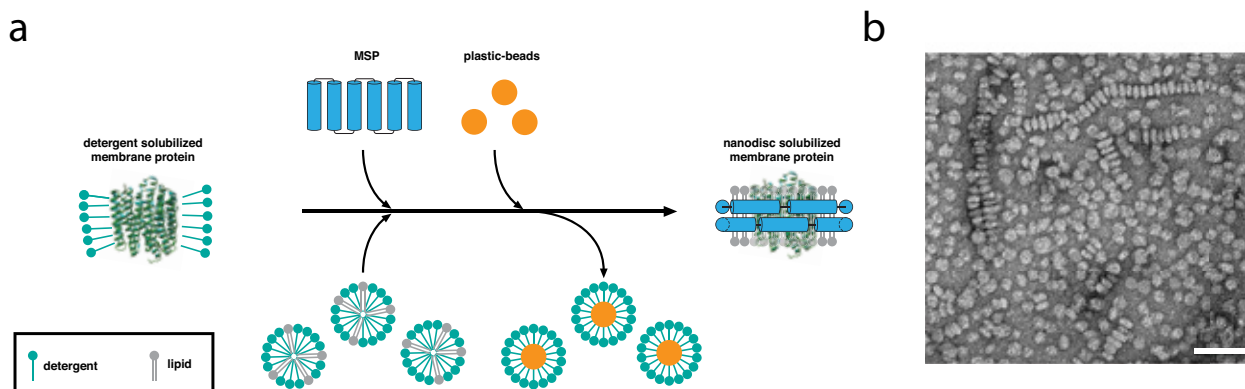


Figure 1. Reconstituting membrane proteins into nanodiscs. **a.** Detergent-solubilized membrane proteins are first mixed with MSP and dissolved lipids. The detergent is subsequently removed by absorption to small, hydrophobic plastic beads. The nanodiscs are formed during this step in a spontaneous reaction, and are kept in solution by binding of two MSP molecules per disc. **b.** Electron microscopic image of negatively stained empty nanodiscs, showing signature top views as well as stacks of side views. Scale bar is 50 nm.

Abbildung 1. Einbau von Membranproteinen in winzige Lipid-Scheibchen (Nanodiscs). **a.** In Seifen gelöste Membranproteine werden zunächst mit MSP und gelösten Lipiden gemischt. Anschließend werden die Seifen-Moleküle an kleine Plastik-Kügelchen gebunden und so entfernt. In einer spontanen Reaktion bilden sich daraufhin winzige Lipid-Scheibchen, stabilisiert durch die MSP, die die Membranproteine aufnehmen. **b.** Elektronenmikroskopische Aufnahme leerer, negativ-kontrastierter Nanodiscs. Erkennbar sind „Draufsichten“ sowie Stapel von „Seitenansichten“. Der Größenmaßstab entspricht 50 nm.

The first alternative was initially described in 2002 by Sligar and coworkers [1] and relies on the use of proteins, which normally keep lipids soluble in our blood stream. Introducing minimal genetic modifications, these proteins could be converted into so-called membrane scaffold proteins (MSP) that keep small disks of lipids (nanodiscs) in solution. These nanodiscs are of exactly the right size to accommodate individual membrane proteins. While we still need to rely on detergents to get membrane proteins into solution, we can replace these in a second step with native lipids during nanodisc formation (Figure 1). Thus, when we actually study the membrane proteins and their structural dynamics, they are residing in a native-like environment. Still, they are also individual, soluble objects as required for structural biology-focussed electron microscopy. In our lab, we are using this approach to study the structures of ion

und verstehen wollen, müssen wir somit ihre natürliche Umgebung so gut wie möglich nachbilden. Im Folgenden möchten wir zwei Alternativen zu Seifen vorstellen, mit denen eine maßgeschneiderte Umgebung für Membranproteine geschaffen werden kann.

Die erste Alternativ-Methode wurde 2002 erstmalig von Sligar und Mitarbeitern beschrieben [1] und verwendet Proteine, die Lipide in unserem Blutkreislauf löslich halten. Durch minimale genetische Veränderungen konnten diese Proteine in sogenannte *membrane scaffold proteins* (MSP) umgewandelt werden, die winzige Lipid-Scheibchen (*Nanodiscs*) in Lösung halten können. Diese Nanodiscs haben genau die richtige Größe, um einzelne Membranproteine aufzunehmen. Zwar werden bei diesen Verfahren auch Seifen genutzt, um Membranproteine in Lösung zu bekommen; diese werden jedoch rasch wieder gegen (native) Lipide ausgetauscht

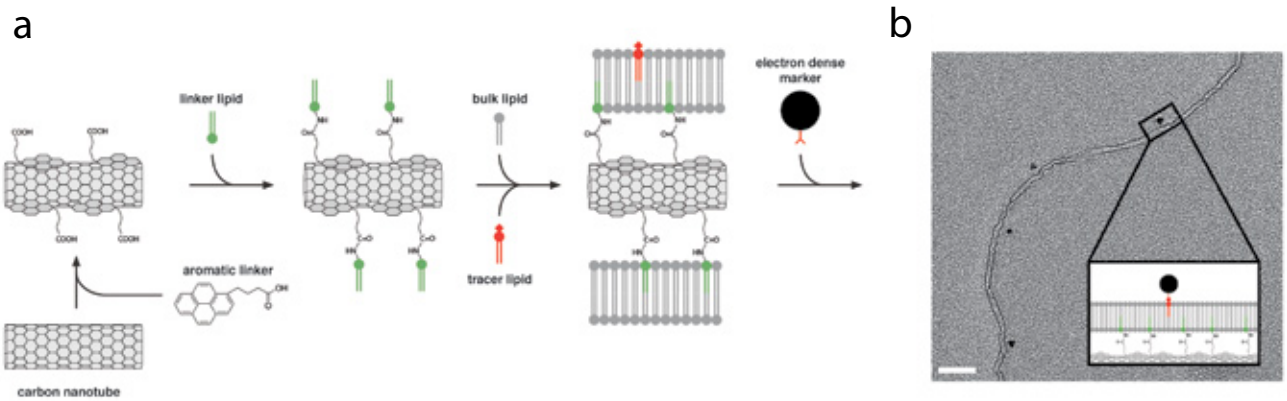


Figure 2. Creating lipid-coated CNTs to study proteins interacting with curved surfaces. **a.** Pristine CNTs offer defined curved surfaces, but are not biocompatible. After functionalization of the surface with an aromatic linker molecule we can introduce a first layer of lipids (depicted green). A full lipid-bilayer is formed spontaneously in a second reaction after addition of a second type of lipids (depicted grey). By introducing a small amount of tracer lipids (depicted red) during this step, we can rely on electron dense markers to verify this reaction. **b.** Electron microscopic image of an unstained lipid-covered CNT labeled by four electron dense markers. Scale bar is 50 nm.

Abbildung 2. Herstellung von Lipid-umhüllten Kohlenstoffnanoröhren zur Untersuchung der Interaktion von Proteinen mit gekrümmten Oberflächen. **a.** Kohlenstoffnanoröhren bieten zwar eine definiert gekrümmte Oberfläche, sind aber nicht biokompatibel. Nach Funktionalisierung der Nanoröhren-Oberfläche mittels eines aromatischen Linkermoleküls können wir eine erste Lipid-Schicht mit der Oberfläche verknüpfen (grün dargestellt). Ausgehend von diesen ersten Lipiden bildet sich eine vollständige Lipid-Hülle nach Zugabe weiterer Lipide (grau dargestellt) in einem zweiten Schritt spontan aus. Durch die Verwendung einer geringen Menge an speziellen Marker-Lipiden (rot dargestellt) können wir dieses im Elektronenmikroskop mit Hilfe von elektronendichten Markern nachweisen. **b.** Elektronenmikroskopische Aufnahme einer ungefärbten, Lipid-umhüllten Kohlenstoff-Nanoröhren, die von vier elektronendichten Markern markiert wurde. Der Größenmaßstab entspricht 50 nm.

channels, with a special focus on dynamic changes. Some membrane proteins require membranes with specific shapes. For example strongly curved membranes - such as found at the endoplasmic reticulum, at the Golgi apparatus or at sites of vesicle endo- and exocytosis - are often recognized by their associated protein machinery due to their unique curvature. Nanodiscs can only mimic flat membranes and are thus not the ideal scaffold for these proteins. Instead, we use in these cases a different alternative to detergents. This approach relies on a seminal discovery of organic chemistry, namely carbon nanotubes (CNT; [2]). These tubes have the right diameter to mimic some of the aforementioned curved membrane surfaces, but their surface is highly denaturing to proteins. Encasing them in a lipid-bilayer solves this issue. Different strategies have been proposed to do this, and we have decided on the use of sticky linker groups

(Abbildung 1). Somit können wir mittels dieser Methode Membranproteine und ihre Dynamik in einer fast nativen Lipidmembran studieren. Dennoch haben wir einzelne, lösliche Objekte, wie man sie für die strukturell biologisch fokussierte Elektronenmikroskopie benötigt. Wir verwenden diese Methode in unserem Labor, um die Struktur von Ionenkanälen aufzuklären, insbesondere mit Blick auf deren strukturelle Dynamik.

Nicht alle Membranproteine benötigen eine flache Lipidumgebung. Insbesondere die sogenannten Endomembransysteme, wie zum Beispiel das Endoplasmatische Retikulum oder die Membranen des Golgi-Apparates, weisen stark gekrümmte Oberflächen auf. Auch während der Umorganisation von Lipidmembranen, zum Beispiel während der Endo- und Exocytose, kommt es temporär zu stark gekrümmten Membranen. Die oben genannten Nanodiscs können jedoch nur flache Membranen nachbilden und sind daher nicht geeignet, diese Prozesse zu untersuchen. Hier kommt die zweite Alternativ-Methode ins

[3]. Using this strategy we can ensure that the physical properties of CNTs, such as their high stiffness and stability, is maintained while creating a biocompatible surface by conjugation of defined lipids (Figure 2). We will use these artificial curved lipid-surfaces to study how membrane-binding proteins recognize their target membranes, and to investigate the structural rearrangements that are subsequently responsible for their activation.

Using either of these two methods we can offer tailor-made environments to the proteins we intend to study, irrespective of their preferred geometry. This allows us to determine their structure, and their structural dynamics, using electron microscopy. Ultimately, this will lead to an improved understanding of their activity, hopefully allowing us to address disease-causing malfunctions.

Spiel, bei der wir auf eine Schlüsselentdeckung der Chemie zurückgreifen: Kohlenstoffnanoröhren (*carbon nanotubes*, „CNTs“; [2]). Diese weisen geeignete Durchmesser auf, um biologische, gekrümmte Oberflächen nachzuahmen. Es gibt aber ein Problem: Ihre Oberflächen entfalten die meisten Proteine und müssen daher erst biokompatibel gemacht werden. Hierzu wurden bereits verschiedene Strategien vorgeschlagen. Wir haben uns für die Verwendung von „klebrigen“ Gruppen entschieden [3]. Diese erhalten wichtige physikalische Eigenschaften der Kohlenstoffnanoröhren, wie zum Beispiel hohe Steifheit und physikalische Stabilität. Gleichzeitig erlauben sie uns definiert Lipide mit der Kohlenstoffnanoröhrenoberfläche zu verknüpfen und so eine biokompatible Lipidoberfläche zu erhalten (Abbildung 2). Mit Hilfe dieser „künstlichen“ gekrümmten Lipidoberflächen werden wir untersuchen wie membranbindende Proteine ihre Zielmembranen erkennen, und welche strukturellen Veränderungen dann dafür verantwortlich sind, dass diese aktiviert werden.

Durch die Verwendung dieser beiden Methoden können wir unterschiedlichsten Proteinen, unabhängig von ihrer jeweilig bevorzugten Membrangeometrie, eine optimale Umgebung bieten. Dieses ermöglicht es uns ihre Struktur sowie deren Dynamik im Elektronenmikroskop zu untersuchen. Dieses wird schlussendlich zu einem besseren Verständnis führen und es uns hoffentlich ermöglichen Fehlfunktionen zu beheben.

References

- [1] Bayburt, T.H., Grinkova, Y.V., A. & Sligar, S.G. (2002) "Self-Assembly of Discoidal Phospholipid Bilayer Nanoparticles with Membrane Scaffold Proteins" *Nano Lett.* 2, 853–856
- [2] Iijima, S. (1991) "Helical microtubules of graphitic carbon" *Nature* 354, 56–58
- [3] Liu, J., Bibari, O., Mailley, P., Dijon, J., Rouvière, E., Sauter-Starace, F., Caillat, P., Vinet, F. & Marchand, G. (2009) "Stable non-covalent functionalisation of multi-walled carbon nanotubes by pyrene–polyethylene glycol through π – π stacking" *New Journal of Chemistry* 33, 1017–1024



Contact

Jakob Macke

Research Center caesar

Max Planck Research Group

Neural Systems Analysis

Phone: +49 (0)228 9656-170

jakob.macke@caesar.de



How do populations of neurons in the visual system compute? – Making sense of complex neural and behavioural data

Wie rechnen neuronale Populationen im Sehsystem? – Komplexe Datensätze sinnvoll interpretieren

Jakob Macke | Max Planck Research Group Neural Systems Analysis

Humans and other mammals use vision extensively as they interact with their environment. Without apparent effort, we can perform complex visual processing tasks – we are able to recognize objects under variations in lighting and viewpoint and in presence of occlusion. The apparent ease with which these tasks can be completed belies the complexity of the underlying computations. While

Wir Menschen nutzen – wie andere Säugetiere auch – immerfort unseren Sehsinn, um unsere Umwelt zu erfassen. Ohne erkennbare Anstrengung können wir selbst komplizierte Seheindrücke verarbeiten. Beispielsweise können wir Objekte erkennen, unabhängig wie die Lichtverhältnisse im Raum sind oder von welcher Seite wir sie sehen. Die scheinbare Leichtigkeit, mit der Menschen und Tiere solche



there has been much progress in computer-based vision systems, none of them come close to rivaling the primate visual system in terms of performance and flexibility.

We are still far from understanding what computations animals use, and how these computations are implemented in the brain. It is believed that they are distributed across large populations of neurons which are organized in intricately wired neural circuits. Thus, we will need to understand how visual information is represented in the activity of neural populations, and how these representations are transformed within and across neural circuits. Recent technologies advances hold the promise of shedding light into the collective properties of neural populations: 2-photon imaging methods can measure neural activity in large populations of neurons, and high-throughput anatomical and molecular techniques provided detailed information about the structure and connectivity of neural circuits. However, it has also become clear that we will need powerful statistical and computational tools for processing these high-dimensional and complex data, and for connecting them to theories of neural computation.

At the same time, the field of machine learning is being revolutionized by novel computer algorithms which are able to extract information from complex data: For example, so called 'deep neural networks' have set new records on a variety of benchmark-tests, and, for the first time, achieve near-human level performance on some specific tasks. Intriguingly, the best artificial vision models have been inspired by canonical properties of neural information processing in the primate visual system. The success of deep neural networks has shown that cascading simple nonlinear units can give rise to models that have impressive computational capabilities – and which greatly exceed those of (current) biological neural network models. Thus, artificial neural networks could provide both benchmarks and conceptual framework for developing new models of sensory processing.

Aufgaben lösen können, täuscht darüber hinweg, wie kompliziert die zugrundeliegenden Berechnungen sind. Obwohl es in den letzten Jahren enorme Fortschritte bei der Entwicklung künstlicher, computer-basierter Sehsysteme gegeben hat, können diese bislang die Leistung und Flexibilität der visuellen Verarbeitung nicht erreichen.

Wir sind weit entfernt davon zu verstehen, wie Tiere visuelle Reize im Gehirn verarbeiten. Man geht davon aus, dass die erforderlichen Berechnungen von großen neuronalen Populationen vorgenommen werden, die ihrerseits in komplexen neuronalen Schaltkreisen organisiert sind. Wir müssen also entschlüsseln, wie visuelle Information in neuronale Aktivität kodiert und in neuronalen Schaltkreisen weiterverarbeitet wird. Jüngste technische Fortschritte geben Anlass zur Hoffnung, die Eigenschaften neuronaler Populationen besser als bislang zu verstehen: Mit 2-Photonen-Mikroskopie kann man die Aktivität großer neuronaler Populationen messen, während moderne anatomische und molekulare Techniken genaue Informationen über die Struktur und die Verschaltungsmuster neuronaler Schaltkreise liefern. Es hat sich allerdings gezeigt, dass mächtige statistische und numerische Verfahren erforderlich sind, um die so entstehenden hochdimensionalen und komplexen Datensätze zu interpretieren und bestehende theoretische Modelle mit diesen Daten „füttern“ zu können.

Zur gleichen Zeit haben neue Computeralgorithmen das Maschinelle Lernen revolutioniert. Mit ihrer Hilfe können Informationen aus komplexen Daten gewonnen werden: sogenannte „tiefe neuronale Netze“ kommen bei einigen Aufgaben erstmals fast an die menschliche Leistungsfähigkeit heran. Interessanterweise sind die besten künstlichen Sehmodelle von Eigenschaften der neuronalen Informationsverarbeitung im Sehsystem von Primaten inspiriert. Der Erfolg dieser tiefen neuronalen Netze hat gezeigt, dass eine Kaskade einfacher nichtlinearer Einheiten Modelle mit beeindruckender Rechenleistung entstehen lässt. Künstliche neuronale Netzwerke können also sowohl Richtwerte als auch den konzeptionellen

We are therefore faced with enormous opportunities for synergy between neuroscience and machine learning: Machine learning provides computational frameworks for modelling sensory processing, as well as practical tools for the analysis of behavioural and neural data. Neuroscience is providing a rich set of data for constraining theories of neural computation, as well as challenging questions for biological data analysis.

The central goal of the group 'Neural Systems Analysis' is to understand how populations of neurons collectively process sensory input, perform computations and control behaviour. To this end, we develop statistical models and machine learning algorithms for large-scale analysis of neural data, and collaborate with experimental laboratories performing measurements of neural activity and behaviour. Our work concentrates on two central questions, which we have been pursuing in collaboration with experimental laboratories at research center caesar and other research institutes:

a) Which sensory inputs modulate neural activity and behavior?

Any theory of how an animal processes sensory inputs is meaningless if we can not measure which sensory inputs are processed by the animal. Doing this requires both experimental tools and paradigms (as are being developed in the department BBO at Caesar), as well as computational tools for relating visual inputs to neural activity and behavior. Which visual inputs cause a neuron to emit spikes? One approach to answering this question is to show many stimuli to an animal while recording spiking activity, and then try to learn a model from those data which relates stimuli and spikes. One challenge of these 'system identification' approaches is that they typically involve models with many parameters and therefore need large data-sets in order to be fit. Thus, it is difficult to apply them to data from behaving or even freely moving animals, for which there are typically strong limitations on data-set sizes. We are therefore developing approaches

Rahmen liefern, um neue Modelle der Sinnesverarbeitung zu entwickeln.

Es entstehen enorme Möglichkeiten der Synergie zwischen Neurowissenschaft und Maschinellen Lernen: Das Maschinelle Lernen stellt Theorien bereit, um die Sinnesverarbeitung zu modellieren, und bietet zusätzlich praktische Werkzeuge, um die erhobenen Daten zu analysieren. Umgekehrt liefert die Neurowissenschaft riesige Datenmengen, um Theorien der Neuronalen Informationsverarbeitung einzuschränken und anzupassen. Zugleich stellt sie die biologische Datenanalyse vor neue Herausforderungen.

Das zentrale Ziel der Gruppe „Neuronale Systemanalyse“ ist es zu verstehen, wie neuronale Populationen gemeinsam Sinnesreize verarbeiten, Berechnungen durchführen und das Verhalten kontrollieren. Zu diesem Zweck entwickeln wir statistische Modelle und maschinelle Lernalgorithmen zur Analyse neuronaler Daten. Wir arbeiten dabei mit Laboren zusammen, die neuronale Aktivität und Verhalten experimentell erfassen. Unsere Arbeit konzentriert sich dabei auf zwei zentrale Fragen, die wir gemeinsam mit Gruppen bei caesar und anderen Forschungsinstituten versuchen zu beantworten:

a) Welche Sinnesreize beeinflussen neuronale Aktivität und Verhalten?

Jede Theorie darüber, wie Tiere Sinnesreize verarbeiten, ist bedeutungslos, wenn wir nicht messen, welche Sinnesreize überhaupt vom Tier verarbeitet werden. Dies erfordert experimentelle Werkzeuge und Paradigmen, wie sie in der Abteilung Behavior and Brain Organization (BBO) bei caesar entwickelt werden. Ebenso benötigen wir mathematische Werkzeuge, die es ermöglichen, die visuellen Reize mit der neuronalen Aktivität und dem Verhalten von Tieren in Verbindung zu bringen. Welche visuellen Reize bringen eine Nervenzelle dazu zu „feuern“? Um diese Frage zu beantworten, zeigen wir einem Tier verschiedene Reize, während wir zeitgleich die neuronalen Antworten messen. Anschließend versuchen wir, aus diesen Daten ein

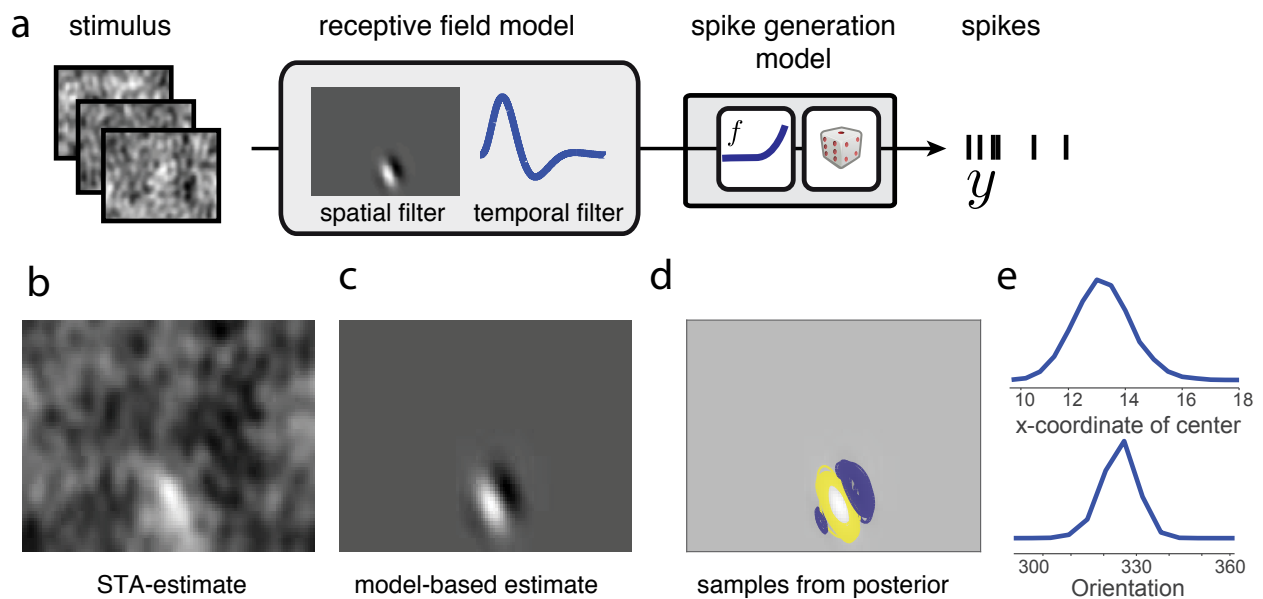


Figure 1. Bayesian inference methods for neural system identification. **a.** We want to determine which stimuli make a neuron spike. This can be done by showing movies to an animal while recording the activity of a neuron, and then looking for a model which can predict neural spiking from a movie. The model is based on a receptive field or spatial filter ('which stimuli is the neuron sensitive to') as well as a temporal filter ('which variations in the stimulus is the neuron sensitive to'). **b.** A classical approach to estimating the spatial filter is to average all those frames that elicit a spike (so called 'spike triggered averaging'). This approach can give rise to very noisy filters, and makes it hard to get quantitative estimates of uncertainty. (Data: BBO department, caesar) **c.** To overcome these limitations, we are developing Bayesian, model-based approaches to receptive field estimation. By incorporating prior knowledge about receptive field structure in the estimation procedure, we can get cleaner estimates from smaller data-set sizes, as illustrated in this example. **d.** Using Bayesian inference, we can generate multiple receptive field models which are all consistent with the experimental data—this allows us to gain insights into which aspects of the receptive field are tightly constrained by the data, and which ones are not. **e.** In particular, it allows us to obtain quantitative uncertainty estimates on important model parameters (such as the location of the receptive field and the preferred orientation).

Abbildung 1. Bayes'sche Inferenzmethoden zur Identifikation neuronaler Systeme. **a.** Wir möchten bestimmen, welche Reize eine neuronale Antwort hervorrufen. Dazu werden einem Tier Filme gezeigt, während parallel die Aktivität einzelner Neurone aufgezeichnet wird. Man sucht nach einem Modell, das diese neuronalen Antworten, also Aktionspotenziale, am besten voraussagen kann. Das Modell enthält ein rezeptives Feld oder einen räumlichen Filter („Auf welchen Reiz reagiert das Neuron?“) und einen zeitlichen Filter („Auf welche Änderungen des Reizes reagiert das Neuron?“). **b.** Ein klassischer Ansatz, um den räumlichen Filter zu schätzen, besteht darin, über alle Einzelbilder zu mitteln, die ein Aktionspotenzial auslösen (sogenanntes *spike triggered averaging*). Dieser Ansatz kann jedoch zu sehr verrauschten Filtern führen und erschwert quantitative Schätzungen der Unsicherheit (Daten: Abteilung BBO, caesar). **c.** Um diese Einschränkungen zu überwinden, entwickeln wir Bayes'sche, modellgestützte Ansätze, mit denen wir den räumlichen Filter schätzen. Integriert man bestehende Kenntnisse über die Struktur rezeptiver Felder bereits in das Schätzverfahren, erhält man weniger verrauschte Filter aus kleineren Datensätzen, wie hier illustrativ gezeigt **d.** Mit Hilfe des Bayes'schen Ansatzes kann man mehrere Modelle rezeptiver Felder erzeugen, die alle mit den experimentellen Daten konsistent sind. Dadurch kann man erkennen, welche Aspekte des rezeptiven Filters durch die Daten gut repräsentiert und eingegrenzt werden und welche nicht. **e.** Insbesondere erlaubt uns dieser Ansatz, quantitative Schätzungen der Unsicherheit wichtiger Parameter zu erlangen (wie zum Beispiel den Ort des rezeptiven Feldes und die bevorzugte Orientierung).

which work more efficiently on smaller data-set sizes, and we use techniques from Bayesian inference to quantify how well the model is constrained by data (see Figure 1).

Modell zu entwickeln, das Reize und neuronale Antworten in Beziehung zueinander setzt. Eine Herausforderung dieses Ansatzes ist, dass man es dabei häufig mit Modellen mit vielen Parametern

b) How can we describe the collective dynamics of neural populations?

Computational models of the collective dynamics of neural populations, and their relationship to sensory stimuli, have been studied extensively by theoretical neuroscientists. However, linking these theoretical models of neural dynamics to experimental data has proven to be a considerable challenge. We still do not know which models are most promising, and how well they can account for empirically observed dynamics. One of our major difficulties in this undertaking comes from the fact that even advanced recording methods can only measure neural activity in a small fraction of all neurons which are putatively involved in a sensory processing tasks. How can one gain insights into the underlying dynamics from such sparse measurements? What analysis approaches are most useful in this process?

Multiple previous studies had used tools from statistical physics to analyse neural population data, and observed properties which seemed surprising the statistics of neural data looked like those of a physical system that is at a co-called 'critical point' For example, zero degree celcius is a critical point for water, as lowering the temperature below that point causes it to freeze, i.e. to dramatically changes its qualitative properties. Physical systems at critical points have many interesting properties, and this observation has therefore given rise to questions about why neural population data might have these unusual statistical properties, and whether this might reflect an optimizing principle of neural information processing.

However, in recent work, we put forward a simple explanation of this (seemingly) puzzling observation: Using both simulations of neural network activity and analytical calculations, we showed that neural populations can look like they are at a critical point when commonly used analysis techniques are applied to them [1]. Thus, rather than reflecting an organizing principle of neural population codes, 'signatures of criticality' are rather a consequence of how neural population

zu tun hat. Dadurch benötigt man sehr große Datenmengen, um diese Parameter anzupassen. Es ist somit schwierig, diese Ansätze auf Daten anzuwenden, die aus Verhaltensexperimenten – möglicherweise sogar mit freilaufenden Tieren – stammen, denn die Datenmenge solcher Experimente ist typischerweise stark begrenzt. Wir entwickeln aus diesem Grund Ansätze, um auch kleine Datensätze effektiver auswerten zu können und nutzen Techniken der schließenden Bayes'schen Statistik, um quantitativ zu erfassen, wie gut die Daten die Modelle bestimmen.

b) Wie können wir die kollektive Dynamik neuronaler Populationen beschreiben?

Modelle zur Berechnung der kollektiven Dynamik neuronaler Populationen und ihre Beziehung zu sensorischen Reizen sind von theoretischen Neurowissenschaftlern bereits intensiv untersucht worden. Jedoch hat es sich als schwierig herausgestellt, die theoretischen Modelle neuronaler Dynamik mit experimentellen Daten in Verbindung zu setzen. Noch wissen wir nicht, welche Modelle wirklich vielversprechend sind und wie gut sie auf empirisch beobachtbare Dynamiken angewendet werden können. Eine unserer größten Schwierigkeiten dabei ist, dass selbst moderne Messmethoden neuronale Aktivität nur bei einem Teil derjenigen Neuronen messen können, die mutmaßlich an der sensorischen Signalverarbeitung beteiligt sind. Was können wir von spärlichen Beobachtungen eines Systems über die zugrundeliegende Dynamik lernen? Was bedeutet das für die neuronale Datenanalyse?

In zahlreichen früheren Studien wurden Methoden der statistischen Physik verwendet, um Daten neuronaler Populationen auszuwerten. Dabei wurden scheinbar überraschende Ergebnissen gefunden: Die Statistik neuronaler Daten sah aus wie die eines physikalischen Systems, das sich an einem sogenannten „kritischen Punkt“ befindet. (Beispielsweise ist 0°C ein kritischer Punkt für Wasser, weil Temperaturen unterhalb dieses Punktes Wasser gefrieren lassen, also seine qualitativen

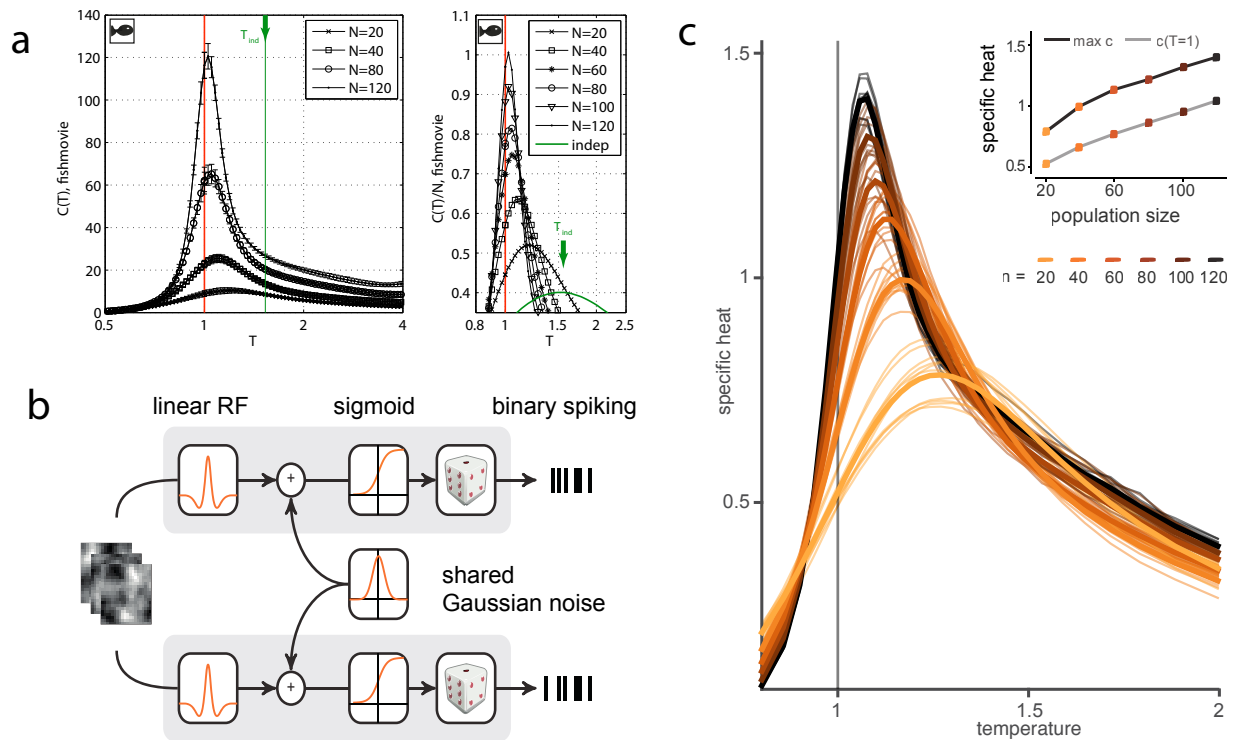


Figure 2. a. Previous studies argued that neural population activity in the retina has statistics which resemble those of a physical system at a critical point (figure reproduced from Tkacik *et al.*, 2014). They plotted the so-called ‘heat-capacity’ (left) and specific heat (right). Specific heat is a measure for how dispersed the frequency of different spike patterns are—for small specific heat, most patterns have a similar probability of occurrence, whereas for large specific heat, some patterns are much more likely than others. The specific heat was found to not saturate for large neural populations, and to be peaked at unit temperature, was interpreted as evidence that the neural populations operate at a critical point. b. To understand which mechanisms are sufficient for this surprising behavior to arise, we set up a simple simulation of retinal ganglion cell activity based on canonical properties of retinal circuitry: Neurons are sensitive to ‘blobs’ in the stimulus, and they fire a spike whenever the stimulus is similar to a blob in the right location. c. In simulated data from this model, we also find signatures of criticality—the peak of the heat curve increases with population size, and is close to the line of unit temperature. This shows that ‘signatures of criticality’ arise generically in these kind of circuits, and casts doubt on whether they are indicative of an underlying coding strategy.

Abbildung 2: Anzeichen für Kritikalität in simplen Modellen der Retina. a. Vorangegangene Studien haben behauptet, dass die Aktivität von neuronalen Populationen in der Retina statistische Eigenschaften aufweisen, wie sie sonst von physikalischen Systemen an einem sogenannten „kritischen Punkt“ bekannt sind (Abbildung übernommen aus Tkacik *et al.*, 2014). Diese Studien untersuchten die aus den Daten berechnete sogenannte Wärmekapazität (links) und spezifische Wärmekapazität (rechts). Die spezifische Wärmekapazität gibt an, wie weit gestreut die Häufigkeiten einzelner Aktivitätsmuster in den Daten sind – bei einer geringen spezifischen Wärmekapazität haben die meisten Aktivitätsmuster eine ähnliche Auftrittswahrscheinlichkeit. Bei einer hohen spezifischen Wärmekapazität gibt es einige Aktivitätsmuster, die sehr viel wahrscheinlicher auftreten als andere. Die aus neuronalen Daten gemessene spezifische Wärmekapazität i) wuchs beständig weiter, je mehr Neurone untersucht wurden, und ii) erreichte ihre höchsten Werte bei Einheitstemperatur. Diese Beobachtungen wurden als Anzeichen gedeutet, dass sich die Aktivität von neuronalen Populationen an einem kritischen Punkt befindet. b. Um zu untersuchen, welche Mechanismen für das Auftreten dieser überraschenden Befunde hinreichend sind, erstellten wir eine simple Simulation für die Aktivität von retinalen Ganglionzellen. Als Ausgangspunkt verwendeten wir allgemein anerkannte Eigenschaften retinaler Netzwerke: Neurone reagieren auf „Kleckse“ in den Stimuli, und sie erzeugen ein Aktionspotential immer dann, wenn der Stimulus einem Klecks an einer bestimmten Stelle im Bild ähnelt. c. In den von unserer Simulation erzeugten Daten finden wir ebenfalls Anzeichen für Kritikalität: die Werte für die spezifische Wärmekapazität werden größer mit wachsender Populationsgröße, und die höchsten Werte werden nahe an der Einheitstemperatur erreicht. Dies zeigt, dass Anzeichen für Kritikalität ein allgemeines Phänomen von solchen Systemen darstellen und zieht in Zweifel, ob das Auftreten solcher Anzeichen ausreicht, um Schlüsse über die Codierung in neuronalen Populationen ziehen zu können.

data is often analyzed. In current work, we are developing new algorithms for fitting mechanistic models of neural population dynamics to neural data, extending our previous work on statistical inference for dynamical systems [1; 2; 3; 4]. These approaches will explicitly model the measurement and subsampling process which is inherent to neural population recordings, and thereby overcome the limitations of commonly used analysis methods.

Eigenschaften dramatisch verändern.) Diese Beobachtung wirft die Frage auf, warum Daten neuronaler Populationen diese ungewöhnliche statistische Eigenschaften aufweisen, und ob sich darin möglicherweise ein Optimierungsprinzip neuronaler Informationsverarbeitung widerspiegelt.

Jedoch konnten wir erst kürzlich eine einfache Erklärung dieser (scheinbaren) rätselhaften Beobachtung finden: Mit Hilfe von Simulationen neuronaler Netzwerkaktivität und analytischen Berechnungen konnten wir zeigen, dass neuronale Populationen immer dann an einem kritischen Punkt zu sein *scheinen*, wenn Analysen aus der statistischen Physik eins-zu-eins auf neuronale Daten übertragen werden. Die rätselhafte Beobachtung ist daher vielmehr eine Konsequenz der Messung und Analyse, als dass sich darin ein tieferliegendes Organisationsprinzip widerspiegeln würde. Zur Zeit entwickeln wir neue Algorithmen, um mechanistische Modelle der Dynamik neuronaler Populationen an neuronale Daten anzupassen. Damit erweitern wir frühere Arbeiten über schließende Statistik für dynamische Systeme. In diesen Ansätzen werden die Messprozesse bei der Aufzeichnung neuronaler Populationen mitmodelliert und so die Grenzen bisheriger Analysemethoden überwunden.

References

- [1] Macke, J.H., Oppen, M. & Bethge, M. (2011) "Common input explains higher-order correlations and entropy in a simple model of neural population activity" *Phys. Rev. Lett.* 106, 208102
- [2] Turaga, S.C. , Buesing, L. , Packer, A.M. , Dalglish, H. , Pettit, N. , Hausser, M , Macke, J.H. (2014) "Inferring neural population dynamics from multiple partial recordings of the same neural circuit" *Advances in Neural Information Processing Systems 26: 27th Conference on Neural Information Processing Systems (NIPS 2013)*, 539-547
- [3] Putzky, P. , Franzen, F. , Bassetto, G. , Macke, J.H. (2015) "A Bayesian model for identifying hierarchically organised states in neural population activity" *Advances in Neural Information Processing Systems 27: 28th Annual Conference on Neural Information Processing Systems (NIPS 2014)*, 3095-3103
- [4] Park, M. , Böhner, G. , Macke, J.H. (2016) "Unlocking neural population non-stationarities using hierarchical dynamics models" *Advances in Neural Information Processing Systems 28: 29th Conference on Neural Information Processing Systems (NIPS 2015)*



Contact

Annett Halle

Research Center caesar

Max Planck Research Group

Neuroimmunology

Phone: +49 (0)228 9656-215

annett.halle@caesar.de



How are immune cells in the brain activated?

Annett Halle | Max Planck Research Group Neuroimmunology

Immune cells, such as microglial cells in the brain and resident macrophages in other organs sense and eliminate viruses and bacteria during infection. This makes them indispensable for the first-line immune defense in our body. However, these cells and their actions also contribute to detrimental illnesses such as Alzheimer's disease, cardiovascular disease and type 2 diabetes.

Wie werden Immunzellen im Gehirn aktiviert?

Spätestens, wenn wir im Winter wieder mit einer Erkältung im Bett liegen, wissen wir: Immunzellen sind wichtig. Sie wehren Viren und Bakterien ab und schützen uns. Beispiele für solche Immunzellen sind Mikrogliazellen im Gehirn und Makrophagen in anderen Organen. Leider haben Immunzellen aber auch eine vielleicht weniger bekannte und überraschende „Schattenseite“: Sie tragen dazu

The Max Planck Research Group “Neuroimmunology” is interested in this second aspect of immune cell action. We have discovered that amyloid- β , a peptide that is important in Alzheimer’s disease pathogenesis, induces the assembly and activation of a multi-protein complex, called the NLRP3 inflammasome, in microglial cells [1]. The NLRP3 inflammasome in turn activates inflammatory cytokines in these cells, which initiate a secondary immune response in the surrounding tissue. Follow-up studies have shown that inflammasome activation accelerates Alzheimer’s disease pathology in transgenic mice and occurs early in Alzheimer’s disease patients [2, 3].

The NLRP3 inflammasome can be activated by many chemically diverse stimuli besides amyloid- β such as ATP, ionophors, ion exchangers and crystals. This promiscuity may be one reason why the inflammasome plays a role in a large variety of diseases. Furthermore, the chemical and structural diversity of stimuli that have the propensity to activate the inflammasome suggests a common activation mechanism rather than specific ligand-receptor binding.

It has been proposed that calcium influx and potassium efflux may be such common trigger of NLRP3 inflammasome activation in immune cells. However, these findings have remained controversial and the molecular mechanisms that explain how calcium and potassium fluxes activate the inflammasome have remained unknown. Many questions regarding quantitative aspects of inflammasome activation have still been unexplored. Some open questions are: What is the kinetics of calcium and potassium fluxes in immune cells upon stimulation with inflammasome activators? How are cytosolic calcium signals temporally related to inflammasome assembly? Do calcium signals always occur prior to inflammasome assembly and are they indispensable for inflammasome activation?

To address these questions, we perform live-cell imaging of genetically modified “inflammasome-reporter” cells that we stimulate with different

bei, dass schwere Krankheiten in unserem Körper entstehen – wie Alzheimer, Diabetes oder kardiovaskuläre Erkrankungen.

Die Max-Planck-Forschungsgruppe Neuroimmunologie interessiert sich für diesen zweiten, krankheitsfördernden Aspekt von Immunzellen. Bei der Alzheimer-Erkrankung spielt β -Amyloid eine wichtige Rolle. Wir haben entdeckt, dass, dieses Peptid in Mikrogliazellen dafür sorgt, dass sich das sogenannte NLRP3-Inflammasom – ein Multiproteinkomplex – zusammenlagert und damit aktiviert wird [1]. Das NLRP3-Inflammasom wiederum reguliert die Freisetzung von entzündlichen Botenstoffen, sogenannten Zytokinen. Die Zytokine locken ihrerseits weitere Immunzellen an und aktivieren diese. Man weiß, dass bei Alzheimer-Patienten das NLRP3-Inflammasom schon sehr früh im Verlauf der Erkrankung aktiviert wird. Zudem führt die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms in Mausmodellen der Alzheimer-Erkrankung zu einem deutlich schnelleren Auftreten Alzheimer-ähnlicher Veränderungen im Gehirn [2, 3].

Das NLRP3-Inflammasom kann von vielen und strukturell sehr unterschiedlichen Stoffen aktiviert werden. Beispiele sind neben β -Amyloid extrazelluläres ATP, Ionophore, Ionenaustauscher und Kristalle. Diese „Promiskuität“ könnte ein Grund dafür sein, dass das Inflammasom an so zahlreichen Krankheiten beteiligt ist. Außerdem weist diese Eigenschaft darauf hin, dass keine direkte Ligand-Rezeptor-Interaktion zwischen den Aktivatoren und dem Inflammasom stattfindet. Stattdessen werden vermutlich zelluläre Mechanismen in Gang gesetzt, die über einen gemeinsamen Signalweg zur Aktivierung des Inflammasoms führen.

Als mögliches „Startsignal“ für einen solchen gemeinsamen Signalweg werden alternativ intrazelluläre Kalzium-Signale und der Ausstrom von Kaliumionen aus der Zelle diskutiert. Allerdings blieb bislang unklar, wie Kalzium-Signale oder ein Kalium-Ausstrom das Inflammasom überhaupt aktivieren können. Insbesondere quantitative Aspekte sind dabei nicht ausreichend untersucht worden. Offene

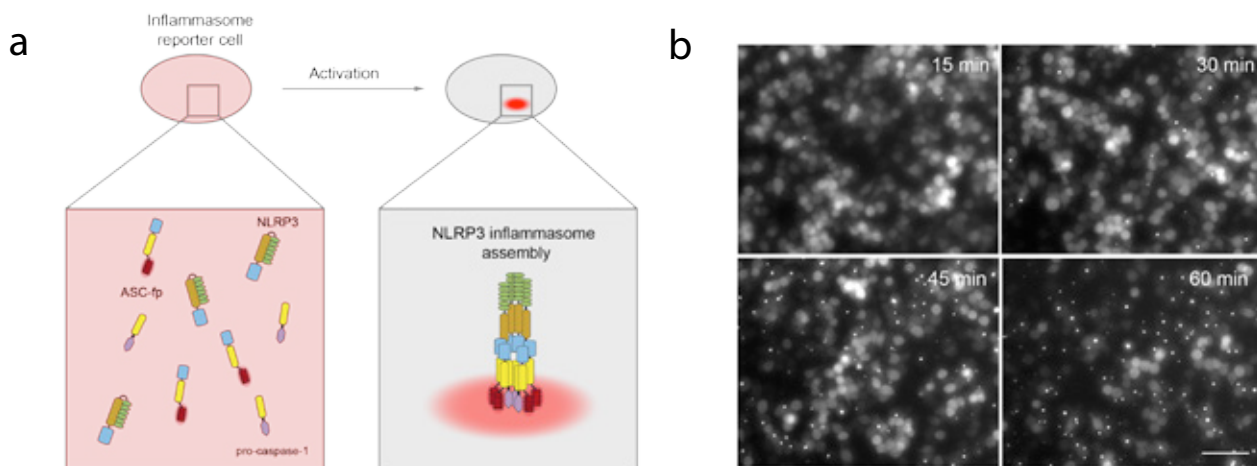


Figure 1: Inflammasome reporter cells. **a.** Schematic drawing of inflammasome reporter cells. Left: Cell prior to activation showing homogeneous ASC-fluorescent protein (ASC-fp) expression and homogeneous distribution of the soluble inflammasome proteins NLRP3, ASC-fp and pro-caspase-1. Right: Cell after activation showing large cytosolic ASC-fluorescent protein aggregates. **b.** Kinetics of fluorescent ASC-fluorescent protein aggregate formation in inflammasome reporter cells upon stimulation with 10 µM nigericin. Scale bar = 50 µm.

Abbildung 1: Inflammasom-Reporterzellen. **a.** Schema einer Inflammasom-Reporterzelle. Links: Die Zelle vor der Aktivierung des Inflammasoms. Alle Moleküle, insbesondere das fluoreszierende Protein ASC-fp und das NLRP3-Inflammasom, sind gleichmäßig verteilt. Rechts: Nach der Aktivierung der Zelle entsteht ein großes fluoreszierendes ASC-Aggregat. **b.** Der zeitliche Verlauf bei der Bildung der ASC-Aggregate in Inflammasom-Reporterzellen nach Stimulation mit 10 µM Nigericin. Maßstabsbalken = 50 µm.

substance classes of inflammasome activators. Specifically, we use macrophage cell lines that express chimera of a fluorescent protein and the inflammasome adapter protein ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD), which in addition to NLRP3 and pro-caspase-1 is the main constituent of the NLRP3 inflammasome (Figure 1a). ASC-fluorescent protein (ASC-fp) is uniformly expressed in inflammasome-reporter macrophages under resting conditions (Figure 1). Upon stimulation with inflammasome activators, ASC-fp chimera form large fluorescent protein aggregates in the cytosol, which allows us to study the kinetics of inflammasome assembly. Using these inflammasome reporter cells in conjunction with fluorescent calcium-sensitive dyes, we found largely diverse cytosolic calcium responses upon stimulation with different substance classes of inflammasome activators. Temporal correlation of calcium signals and inflammasome signals showed calcium peaks prior to inflammasome assembly upon stimulation with some but not all inflammasome activators. For example, stimulation

Fragen sind: Wie ist der zeitliche Ablauf von Kalzium-Signalen und Kalium-Ausstrom nach Stimulation mit Inflammasom-Aktivatoren? In welchem Bezug steht diese Kinetik zur Aktivierung des Inflammasoms? Treten die Kalzium-Signale immer vor der Zusammenlagerung des Inflammasomkomplexes auf? Sind Kalzium-Signale unverzichtbar für eine Aktivierung des Inflammasoms?

Um diese Fragen beantworten zu können, müssen wir zunächst wissen, zu welchem Zeitpunkt das Inflammasom genau aktiviert wird. Dazu haben wir in „Inflammasom-Reporterzellen“ Einzelzellmessungen durchgeführt. Inflammasom-Reporterzellen sind gentechnisch veränderte Makrophagen, die ein Protein namens ASC-fp, fluoreszierendes ASC, exprimieren. ASC ist ein wichtiger Bestandteil des Inflammasoms. ASC-fp ist unter normalen Bedingungen sehr homogen in der Zelle verteilt. Wird die Zelle allerdings mit Inflammasom-Aktivatoren stimuliert, bildet sich ein großes, fluoreszierendes ASC-Aggregat im Zytosol der Zelle (Abbildung 1). Dies erlaubt

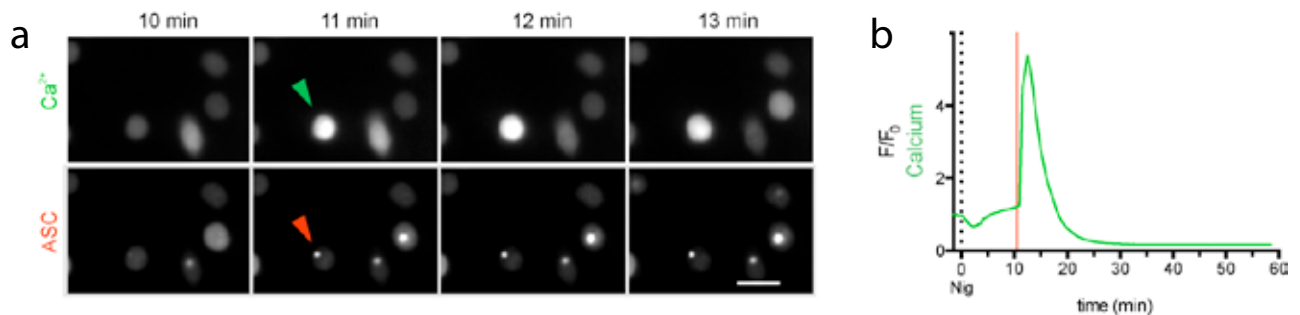


Figure 2: Temporal correlation of calcium signals and inflammasome assembly. **a.** Live-cell fluorescence images of calcium signals (Cal 520-AM; green, upper row) and ASC-fluorescent protein aggregate formation as a read-out for inflammasome activation (red, lower row) upon stimulation with 10 μ M nigericin. Scale bar = 20 μ m. **b.** Calcium signal (green trace) of a representative cell upon nigericin stimulation. ASC-fluorescent protein aggregate formation occurs 11 min after stimulation onset, before calcium increase.

Abbildung 2: Korrelation von Kalzium-Signalen und Inflammasom-Aktivierung. **a.** Bilderserie von Inflammasom-Reporterzellen nach Aktivierung mit 10 μ M Nigericin. Dargestellt sind Kalzium-Signale (Kalziumindikator Cal 520-AM, obere Reihe) und die Kinetik der ASC-Aggregat-Bildung als Zeichen der Inflammasom-Aktivierung (untere Reihe). Maßstabsbalken = 20 μ m. **b.** Graphische Darstellung der Kalzium-Signale (grüne Linie einer repräsentativen Zelle über einen Zeitverlauf von 60 Minuten). Der rote Strich zeigt den Zeitpunkt an, an dem sich das ASC-Aggregat bildet.

with the inflammasome activator nigericin did not induce calcium signals prior to but only following inflammasome assembly (Figure 2).

Finally, removing extracellular calcium from the cell culture medium and/or pharmacologically depleting intracellular calcium stores abolished all detectable cytosolic calcium signals in inflammasome reporter cells but did not interfere with or delay inflammasome assembly. Together, these findings do not support calcium signaling as a common trigger of NLRP3 inflammasome assembly, contrary to previous reports.

In on-going work we investigate the hypothesis that a low intracellular potassium concentration may be a unifying signaling step in inflammasome activation, again utilizing inflammasome reporter cells. In a novel methodological approach in collaboration with the Department of Molecular Sensory Systems we employ the whole-cell patch clamp technique to specifically manipulate the intracellular ion milieu of inflammasome reporter cells on a single cell level. We found that lowering the intracellular potassium

es uns herauszufinden, wann genau sich das Inflammasom zusammenlagert und aktiviert wird.

Wir haben die Inflammasom-Reporterzellen zusammen mit Kalzium-Indikatoren verwendet, um die Kinetik von Kalzium-Signalen in Immunzellen zu untersuchen. Hierbei fanden wir nach Stimulation mit verschiedenen Klassen von Inflammasom-Aktivatoren sehr unterschiedliche Kalzium-Antworten. Bei einem Teil der Aktivatoren waren Kalzium-Signale vor der Bildung des Inflammasom-Komplexes messbar, jedoch nicht bei allen. Beispielsweise konnten nach Stimulation mit dem Inflammasom-Aktivator Nigericin Kalzium-Signale nur nach der Inflammasom-Aktivierung gemessen werden (Abbildung 2).

Die Verwendung von Kalzium-freiem Zellkulturmedium und die pharmakologische Entleerung der intrazellulären Kalzium-Speicher führten zudem zwar zum vollständigen Ausbleiben aller zuvor gemessenen Kalzium-Signale, beeinflussten die Kinetik der Inflammasom-Aktivierung jedoch nicht wesentlich. Entgegen der bisherigen Annahme

concentration with this method indeed induces the assembly of the inflammasome (Figure 3). To learn more about the involved molecular mechanisms we currently pin down the intracellular ion composition and concentration that is necessary. We also test whether these experimentally induced inflammasomes are fully active and mediate caspase-1 and cytokine activation.

We are convinced that this methodological approach will help us to answer open questions on the role of intracellular ions in immune cells and will shed more light on the common molecular mechanisms that control inflammasome activation.

sprechen unsere Ergebnisse daher eindeutig gegen eine entscheidende Rolle von intrazellulären Kalzium-Signalen bei der Inflammasom-Aktivierung.

In aktuellen Projekten untersuchen wir die alternative Hypothese, dass ein Kalium-Ausstrom für die Inflammasom-Aktivierung entscheidend ist. Hierfür werden wiederum Inflammasom-Reporterzellen verwendet. In Zusammenarbeit mit der Abteilung Molekulare Neurosensorik benutzen wir als neuen methodischen Ansatz die Patch-Clamp-Technik. Mit dieser Technik können wir das intrazelluläre Ionenmilieu genau kontrollieren und beeinflussen. In bisherigen Untersuchungen konnten wir feststellen, dass eine niedrige Kaliumkonzentration in der untersuchten Zelle tatsächlich zu einer Inflammasom-Aktivierung führt (Abbildung 3). Um mehr über die dahinterstehenden Mechanismen zu erfahren, untersuchen wir derzeit, welche genaue Ionenkomposition und -konzentration nötig ist, damit das Inflammasom aktiviert wird. Außerdem testen wir, ob die mit der Patch-Camp-Technik ausgelösten Inflammasom-Komplexe auch voll funktionstüchtig sind und zur Aktivierung von Zytokinen führen.

Wir sind davon überzeugt, dass dieser methodische Ansatz uns dabei helfen wird, viele offene Fragen zu den Aktivierungsmechanismen des NLRP3-Inflammasoms zu beantworten.

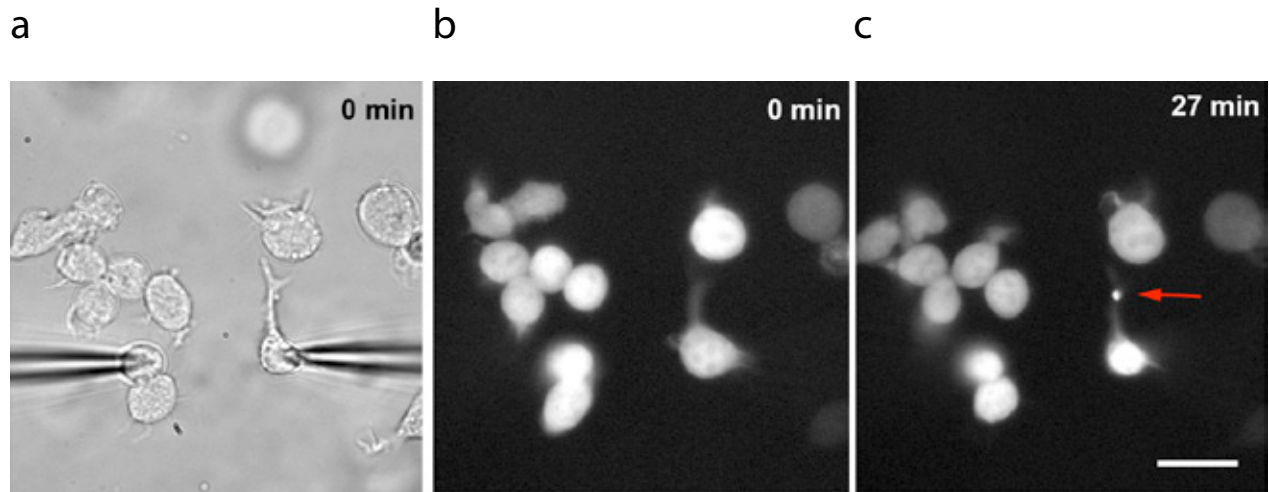


Figure 3: Manipulating the intracellular ion composition of immune cells with the whole-cell patch clamp technique. Two inflammasome reporter cells were brought into whole-cell configuration with patch pipettes with the right patch pipette containing 130 mM NaCl and the left pipette 130 mM KCl in the intracellular solution. After 27 min the right but not the left cell shows an ASC-fp aggregate as a sign of inflammasome assembly. **a.** Transmission light image and **b.** fluorescence image at the beginning of the experiment and **c.** after 27 min. Scale bar = 20 μ m.

Abbildung 3: Gezielte Manipulation des intrazellulären Ionen-Milieus in Immunzellen durch die Patch-Clamp-Technik. Zwei Zellen wurden in die sogenannte *Whole-Cell*-Konfiguration gebracht. Die rechte Patch-Pipette enthielt dabei eine Lösung mit 130 mM NaCl und die linke Patch-Pipette eine Lösung mit 130 mM KCl. In der rechten Zelle ist im Zeitverlauf ein ASC-Aggregat erkennbar (roter Pfeil). **a.** Durchlicht-Bild und **b.** Fluoreszenzbild zu Beginn des Experiments. **c.** Fluoreszenz-Bild nach 27 Minuten. Maßstabsbalken = 20 μ m.

References

- [1] Halle, A., Hornung, V., Petzold, G.C., Stewart, C.R., Monks, B.G., Reinheckel, T., Fitzgerald, K.A., Latz, E., Moore, K.J. & Golenbock, D.T. (2008) "The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta" *Nat. Immunol.* 9, 857-865
- [2] Heneka, M.T., Kummer, M.P., Stutz, A., Delekate, A., Schwartz, S., Vieira-Saecker, A., Griep, A., Axt, D., Remus, A., Tzeng, T.C., Gelpi, E., Halle, A., Korte, M., Latz, E. & Golenbock, D.T. (2013) "NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice" *Nature* 493, 674-678
- [3] Heneka, M.T., Carson M.J., El Khoury, J., Landreth, G.E., Brosseron, F., Feinstein, D.L., Jacobs, A.H., Wyss-Coray, T., Vitorica, J., Ransohoff, R.M., Herrup, K., Frautschy, S.A., Finsen, B., Brown, G.C., Verkhratsky, A., Yamanaka, K., Koistinaho, J., Latz, E., Halle, A., Petzold, G.C., Town, T., Morgan, D., Shinohara, M.L., Perry, V.H., Holmes, C., Bazan, N.G., Brooks, D.J., Hunot, S., Joseph, B., Deigendesch, N., Garaschuk, O., Boddeke, E., Dinarello, C.A., Breitner, J.C., Cole, G.M., Golenbock, D.T., Kummer, M.P. "Neuroinflammation in Alzheimer's disease" *Lancet Neurol.* 14, 388-405

Contact

Jürgen Reifarth / Stefan Hartmann

Research Center caesar

Press und Public Relations

Phone: 49 (0)228 9656-107 / -292

juergen.reifarth@caesar.de / stefan.hartmann@caesar.de



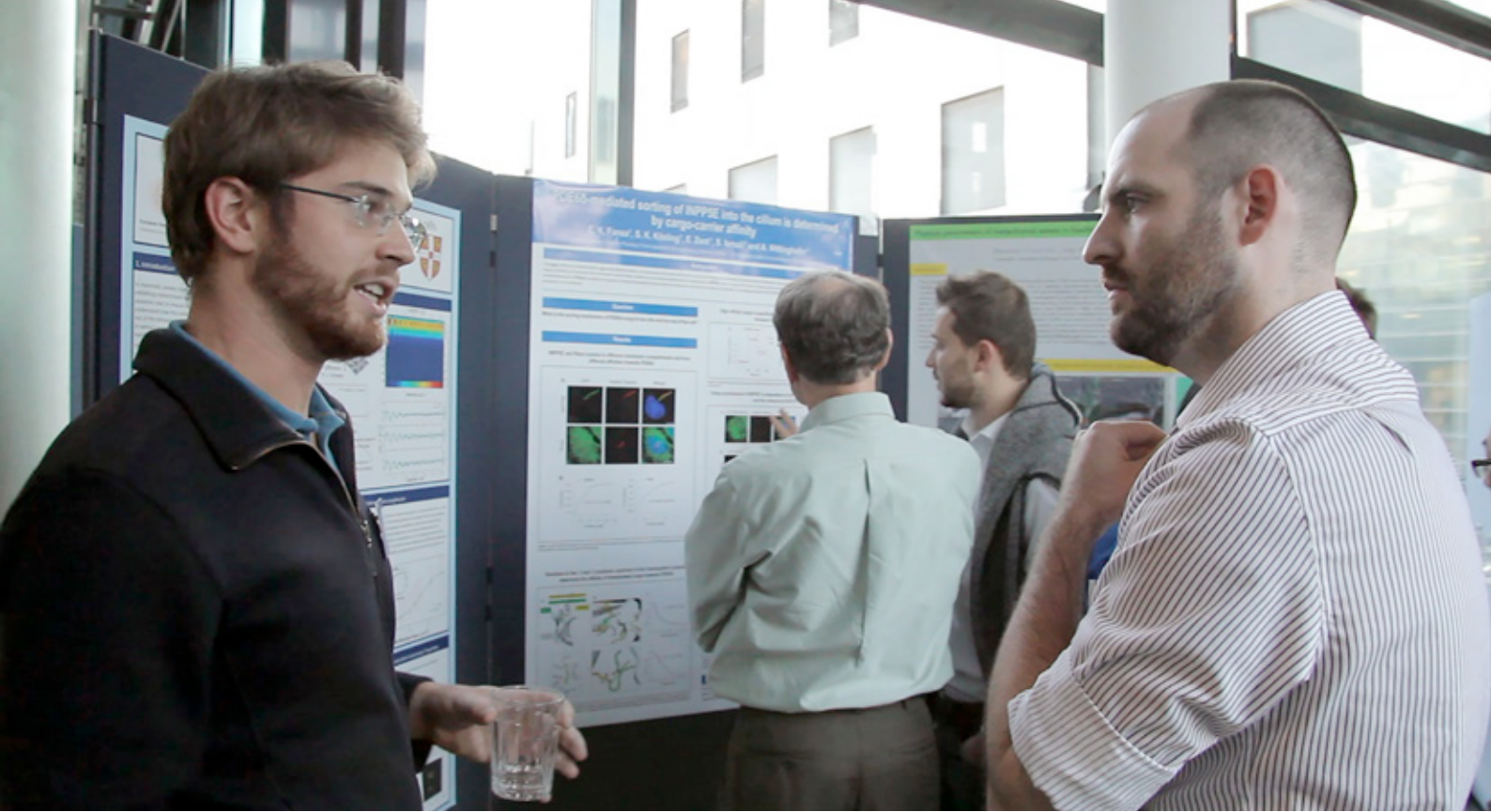
Celebrating an anniversary – 20 years of caesar

Jürgen Reifarth and Stefan Hartmann | Press and Public Relations

It is 20 years ago, on 11 July 1995 to be precise, since the caesar Foundation was formed and there are many reasons to celebrate this anniversary: the research center is now firmly established in Bonn and in the research landscape, too; the close association with the Max Planck Society has proved its worth; the funding is assured via the endowment fund; and the research building

Ein Jubiläum feiern – 20 Jahre caesar

Vor 20 Jahren genau am 11. Juli 1995, wurde die Stiftung caesar gegründet und es gibt viele Gründe, dieses Jubiläum zu feiern: Das Forschungszentrum ist in Bonn und der Forschungslandschaft etabliert, die enge Anbindung an die Max-Planck-Gesellschaft hat sich bewährt, die Finanzierung ist über das Stiftungskapital gesichert und das Forschungsgebäude bietet optimale



Discussion at the poster session of the 5th International caesar Conference. The conference brought together the world's best scientists in the field of primary cilia and actively motile cilia.

Diskussion bei der Posterpräsentation im Rahmen der 5th International caesar Conference. Die Konferenz brachte die weltweit besten Wissenschaftler auf dem Gebiet der primären Zillien und der aktiv beweglichen Zillien zusammen.

provides the best possible working conditions. However, all these are merely framework conditions for what caesar is really about: excellent scientific research. This is why the anniversary celebrations, too, should focus on the science.

Arbeitsbedingungen. Doch dies alles sind nur Randbedingungen für den eigentlichen Kern von caesar: exzellente wissenschaftliche Forschung. Deshalb sollte auch bei den Jubiläumsfeierlichkeiten die Wissenschaft im Mittelpunkt stehen.

Celebrating science

From a scientific point of view, the highlight of the anniversary events was the 5th International caesar Conference entitled *The Omnipresent Cilium - Structure, Signalling, and Motion*. The conference brought together the world's best scientists in the field of primary cilia and actively motile cilia. The focus was on signal processing and signal transmission in these two types. Theoreticians were able to have cross-disciplinary exchanges with their colleagues working on experimental aspects. An important aim of the conference was to also provide a forum for junior scientists in the form of poster presentations and short talks.

Wissenschaft feiern

Aus wissenschaftlicher Sicht war der Höhepunkt der Jubiläumsveranstaltungen die 5th International caesar Conference mit dem Titel *The Omnipresent Cilium - Structure, Signalling, and Motion*. Die Konferenz brachte die weltweit besten Wissenschaftler auf dem Gebiet der primären Zillien und der aktiv beweglichen Zillien zusammen. Der Schwerpunkt der Konferenz lag auf der Signalverarbeitung und Signalübertragung bei diesen beiden Typen. Theoretisch arbeitende Wissenschaftler konnten sich mit ihren experimentell arbeitenden Kollegen über die Fachgrenzen hinweg austauschen. Ein wichtiges Ziel der Konferenz war es, auch Nachwuchswissenschaftlern ein Forum zu bieten, in Form von Posterpräsentationen und kurzen Vorträgen.

But caesar promotes not only the interdisciplinary exchange between the scientists themselves. Its aim is also to take the scientific topics into the public domain. In the anniversary year, the Institute realized this objective by building on its successful formats, particularly on the popular *caesarium* series of talks. Well-known scientists give a comprehensible public talk about their research field and their research findings to a lay audience. The event is regularly attended by more than 200 interested members of the public. This exceeds the capacity of the lecture hall. Many listeners cannot find a seat in the lecture hall and put up with the inconvenience of watching a live broadcast in the entrance hall.

Doch nicht nur der fachübergreifende Austausch der Wissenschaftler untereinander wird bei caesar gefördert. Die wissenschaftlichen Themen sollen auch in die Öffentlichkeit transportiert werden. Im Jubiläumsjahr baute das Institut bei der Umsetzung dieses Ziels auf die bewährten Formate auf, insbesondere auf die beliebte Vortragsreihe *caesarium*. Bekannte Wissenschaftler tragen ihr Forschungsgebiet und ihre Forschungsergebnisse in einem öffentlichen Vortrag einem gebildeten Laienpublikum verständlich vor. Regelmäßig wird diese Veranstaltung von mehr als 200 Interessierten besucht. Damit ist die Kapazität des Hörsaales überschritten. Viele Zuhörer finden keinen Platz mehr im Hörsaal und nehmen die Unannehmlichkeit einer Übertragung in die Eingangshalle auf sich.



A new format at caesar: the Science Quartet. Joachim L. Schultze, U. Benjamin Kaupp, Waldemar Kolanus and Michael Hoch (f.l.t.r.) discuss how science will have changed medicine in 2050.

Ein neues Format für caesar: das Wissenschaftliche Quartett. Joachim L. Schultze, U. Benjamin Kaupp, Waldemar Kolanus und Michael Hoch (v.l.n.r.) diskutieren, wie die Wissenschaft die Medizin im Jahr 2050 verändert haben wird.



Caesar at the open day held at Villa Hammerschmid. The then mayor of Bonn, Jürgen Nimptsch, visits caesar's event tent.

Caesar am Tag der offenen Tür der Villa Hammerschmidt. Der damalige Oberbürgermeister der Stadt Bonn, Jürgen Nimptsch, stattet dem Zelt von caesar einen Besuch ab.

A new format was also established – the *Science Quartet* – so that science could not only be reported on, but discussed as well. Four scientists shed light on the development and long-term prospects of a particular scientific direction. They discuss not only the impacts on other scientific disciplines but also the influences from other fields. The first topic was: *How will science have changed medicine in 2050?* The response to this event has encouraged caesar to pursue this format further and provide a platform for more controversial debates as well in the future.

Caesar goes to town

Not everyone knows what caesar is. So it has had to undertake public outreach work as well. In the autumn, Caesar was involved in the *Dies academicus* at the University of Bonn, and its contribution to this successful event was to illustrate the close link between caesar and the University of Bonn using the example of photonics research. The same goal was pursued by taking part in the *Uni im Rathaus* (university in the town hall) series of events with Max Planck Fellow Prof. Famulok, who works both

Um über Wissenschaft nicht nur zu berichten, sondern auch zu diskutieren, wurde zusätzlich ein neues Format eingerichtet – das *Wissenschaftliche Quartett*. Vier Wissenschaftler beleuchteten die Entwicklung und langfristige Perspektive einer wissenschaftlichen Richtung. Sowohl die Wirkungen auf andere Wissenschaftsdisziplinen als auch die Einflüsse aus anderen Gebieten wurden diskutiert. Erstes Thema war: *Wie wird die Wissenschaft die Medizin im Jahr 2050 verändert haben?* Die Resonanz auf diese Veranstaltung ermutigt caesar, dieses Format weiter zu verfolgen und zukünftig auch kontroverseren Debatten eine Bühne zu bereiten.

Caesar geht in die Stadt

Nicht für jeden ist caesar eine bekannte Größe. Deshalb war es notwendig, auch nach außen zu gehen. Caesar hat im Herbst am *Dies academicus* der Universität Bonn teilgenommen und im Rahmen dieser bewährten Veranstaltung am Beispiel der photonischen Forschung die enge Verbindung zwischen caesar und der Universität Bonn aufgezeigt. Dem gleichen Ziel diene die

at caesar and at the University of Bonn.

A particularly large number of people were introduced to caesar at the *open day held at Villa Hammerschmidt* (the Bonn residence of the German President), where caesar had a stand of its own. Several thousand visitors demonstrated their interest in caesar and many children looked down the microscope to observe the phototactical behavior of green algae.

New events

Caesar was able to try out new formats with the help of, and in collaboration with, the University. Particular mention should be made of another first for caesar: a so-called *Kinderuni*, which took the form of a microscopy day for children of primary

Teilnahme an der Veranstaltungsreihe *Uni im Rathaus* mit dem Max-Planck-Fellow Prof. Famulok, der sowohl bei caesar als auch an der Universität Bonn arbeitet.

Besonders viele Menschen lernten caesar am *Tag der offenen Tür der Villa Hammerschmidt* kennen, bei dem caesar mit einem eigenen Stand vertreten war. Mehrere tausend Besucher interessierten sich für caesar und viele Kinder warfen einen Blick in das Mikroskop, um das phototaktische Verhalten der Grünalge zu beobachten.

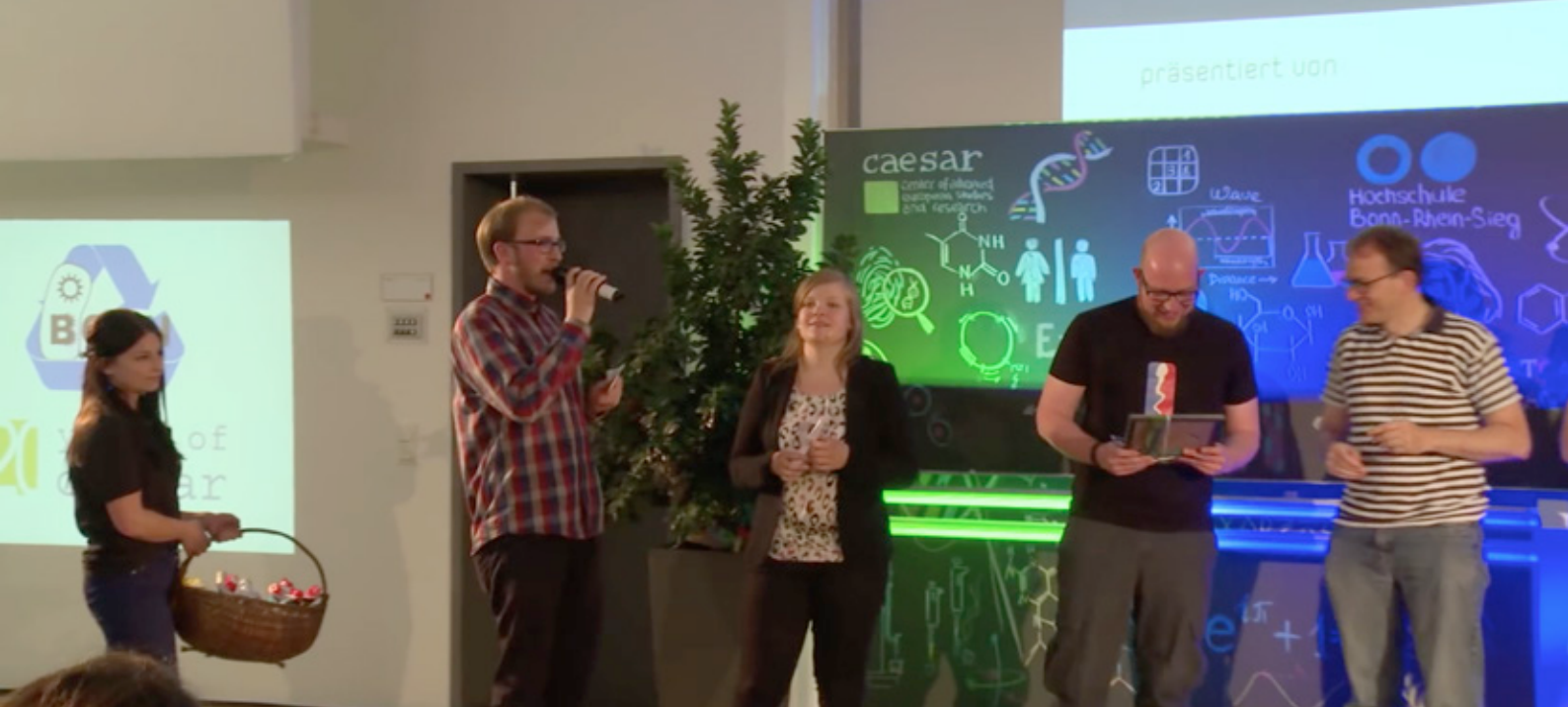
Neue Angebote

Mithilfe und in Zusammenarbeit mit der Universität konnten neue Formate bei caesar ausprobiert werden. Hier ist insbesondere zu erwähnen, dass caesar erstmals eine so genannte *Kinderuni* durchgeführt hat, einen Tag der Mikroskopie für



Children's university. The young researchers made a voyage into the nanoworld.

Kinderuni bei caesar. Die jungen Forscher machten bei caesar eine Reise in die Nanowelt.



Science Slam. David Fußhöller (second from right), postdoc at caesar, wins with his talk „Biochemie während der Zigarette danach“, a talk about the biochemical principles of sperm attraction and navigation.

Science Slam. David Fußhöller (zweiter von rechts), Postdoktorand bei caesar, gewinnt mit seinem Vortrag „Biochemie während der Zigarette danach“, in dem er beschreibt, wie Spermien von der Eizelle angelockt werden.

school age. Committed staff from the Institute organized a large number of talks, guided tours and experiments. Several hundred of Bonn's students visited the Institute when it held its first *Science Slam*. Happily, the competition was won by a former doctoral student at caesar.

The Science Slam and the Kinderuni succeeded in reaching out to completely new social groups and enticing them into the Institute. caesar and science were put across in a simple and entertaining way. The Science Slam and Kinderuni are to be continued in the years to come as well.

On a final note, caesar also uses cultural formats to draw attention to itself. A *hörbar* (literary event) was organized, again in collaboration with the University of Bonn. In a charming presentation, the Secretary General of the German Research Foundation, Dorothee Dzwonnek, talked about three of her favourite books.

The art exhibitions in caesar's publicly accessible spaces are also aimed at members of the public with an interest in culture. The first exhibition of 2015 had "About searching and finding" as its motto. The second exhibition "Kultur meets culture" was organized in cooperation with an international association of artists.

Kinder im Grundschulalter. Engagierte Mitarbeiter des Institutes organisierten eine Vielzahl von Vorträgen, Besichtigungen und Experimenten. Mehrere hundert Bonner Studenten fanden den Weg ins Institut, als dort der erste *Science Slam* durchgeführt wurde. Erfreulicherweise ging ein ehemaliger Doktorand von caesar aus diesem Wettbewerb als Sieger hervor.

Mit dem Science Slam und der Kinderuni ist es gelungen, ganz neue Bevölkerungsschichten anzusprechen und ins Institut zu locken. Auf leichte und unterhaltsame Weise wird ihnen caesar und Wissenschaft näher gebracht. Auch in den folgenden Jahren sollen der Science Slam und die Kinderuni fortgesetzt werden.

Schließlich nutzt caesar auch kulturelle Formate, um auf sich aufmerksam zu machen. Wiederum in Zusammenarbeit mit der Universität Bonn wurde eine Veranstaltung der *hörbar* durchgeführt. Im Rahmen einer charmanten Moderation stellte die Generalsekretärin der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Dorothee Dzwonnek, drei ihrer Lieblingsbücher vor.

Ebenso an ein kulturinteressiertes Publikum wenden sich die Kunstaussstellungen in den öffentlich zugänglichen Räumen von caesar. Die erste Ausstellung des Jahres 2015 stand



„hörbar“. Anja Stadler, artistic director of the Bonn University, in conversation with the Secretary General of the German Research Foundation (DFG), Dorothee Dzwonnek.

„hörbar“. Anja Stadler, Kulturintendandin der Universität Bonn, im Gespräch mit der Generalsekretärin der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Dorothee Dzwonnek.

All talks at caesar are recorded by several cameras and edited to videos which are accessible to the public; short trailers giving some impressions are produced for other events. This multimedia aspect was greatly expanded and made more professional in the anniversary year. More and more people are subscribing to caesar's *Youtube* channel; some recordings of talks have already had several thousand hits. caesar is thus becoming known beyond its regional boundaries, too.

In its anniversary year, caesar's public events enabled it to make direct contact with way over 5,000 people overall. As the mayor of Bonn said to us, this extremely high level of commitment meant that "caesar was beloved in the region".

unter dem Motto „Vom Suchen und Finden“. Die zweite Ausstellung „Kultur trifft culture“ wurde in Kooperation mit einem internationalen Künstler-Verein durchgeführt.

Sämtliche Vorträge bei caesar werden mit mehreren Kameras aufgezeichnet und zu öffentlich zugänglichen Videos geschnitten; von anderen Veranstaltungen werden kurze Trailer mit Impressionen produziert. Im Jubiläumsjahr wurde dieser multimediale Bereich stark ausgeweitet und professionalisiert. Der *Youtube*-Channel von caesar findet immer mehr Abonnenten; manche Vortragsaufzeichnungen umfassen bereits mehrere Tausend Aufrufe. Auf diese Weise wird caesar auch über die regionalen Grenzen hinweg bekannt.

Insgesamt wurden bei öffentlichen Veranstaltungen im Jubiläumsjahr weit mehr als 5000 Menschen unmittelbar erreicht. Aufgrund dieses außerordentlich großen Engagements, so der Oberbürgermeister der Stadt Bonn gegenüber dem Forschungszentrum, werde „caesar in der Region geliebt“.



„Vom Suchen und Finden“ - art exhibition at caesar.

„Vom Suchen und Finden“ - Kunstaussstellung bei caesar.



Publikationen

Publications

- 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
- Börger, C., Schünke, S., Lecher, J., Stoldt, M., Winkhaus, F., Kaupp, U.B. & Willbold, D. (2015) "Resonance assignment of the ligand-free cyclic nucleotide-binding domain from the murine ion channel HCN2" *J. Biomol. NMR* 9, 243 - 246
- Czeschik, A., Rinklin, P., Derra, U., Ullmann, S., Holik, P., Steltenkamp, S., Offenhäusser, A. & Wolfrum, B. (2015) "Nanostructured cavity devices for extracellular stimulation of HL-1 cells" *Nanoscale* 7, 9275 - 9281
- Egger, R., Schmitt, A.C., Wallace, D.J., Sakmann, B., Oberlaender, M. & Kerr, J.N.D. (2015) "Robustness of sensory-evoked excitation is increased by inhibitory inputs to distal apical tuft dendrites" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112, 14072 - 14077
- Fechner, S., Alvarez, L., Bönigk, W., Müller, A., Berger, T., Pascal, R., Trötschel, C., Poetsch, A., Stölting, G., Siegfried, K.R., Seifert, R. & Kaupp, U.B. (2015) "A K⁺-selective CNG channel orchestrates Ca²⁺ signalling in zebrafish sperm" *eLife* 4, e07624
- Greifenberg, A.K., Höning, D., Pilarova, K., Düster, R., Bartholomeeusen, K., Bösen, C., Anand, K., Blazek, D. & Geyer, M. (2016) "Structural and functional analysis of the Cdk13/cyclin K complex" *Cell Rep.* 14, 320 - 331
- Herzog, H., Klein, A., Bleckmann, H., Holik, P., Schmitz, S., Siebke, G., Tätzner, S., Lacher, M. & Steltenkamp, S. (2015) "μ -biomimetic flow-sensors—introducing light-guiding PDMS structures into MEMS" *Bioinspir. Biomim.* 10, 036001
- Herzog, H., Steltenkamp, S., Klein, A., Tätzner, S., Schulze, E. & Bleckmann, H. (2015) "Micro-machined flow sensors mimicking lateral line canal neuromasts" *Micromachines* 6, 1189 - 1212
- Jansen, V., Alvarez, L., Balbach, M., Strünker, T., Hegemann, P., Kaupp, U.B. & Wachten, D. (2015) "Controlling fertilization and cAMP signaling in sperm by optogenetics" *eLife* 4, e05161
- Jikeli, J., Alvarez, L., Friedrich, B.M., Wilson, L.G., Pascal, R., Colin, R., Pichlo, M., Rennhack, A., Brenker, C. & Kaupp, U.B. (2015) "Sperm navigation along helical paths in 3D chemoattractant landscapes" *Nat. Comm.* 6, 7985
- Kadavath, H., Hofele, R.V., Biernat, J., Kumar, S., Tepper, K., Urlaub, H., Mandelkow, E. & Zweckstetter, M. (2015) "Tau stabilizes microtubules by binding at the interface between tubulin heterodimers" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112, 7501 - 7506
- Kadavath, H., Jaremko, M., Jaremko, L., Biernat, J., Mandelkow, E. & Zweckstetter, M. (2015) "Folding of the Tau Protein on microtubules" *Angewandte Chemie International Edition in English Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 54, 10347 - 10351
- Kirmizialtin, S., Loerke, J., Behrmann, E., Spahn, C.M.T. & Sanbonmatsu, K.Y. (2015) "Chapter Sixteen - Using Molecular Simulation to Model High-Resolution Cryo-EM Reconstructions" *Methods Enzymol.* 558, 497 - 514

Küffner, R., Zach, N., Norel, R., Hawe, J., Schoenfeld, D., Wang, L., Li, G., Fang, L., Mackey, L., Hardiman, O., Cudkowicz, M., Sherman, A., Ertaylan, G., Grosse-Wentrup, M., Hothorn, Seelig, J.D. & Jayaraman, V. (2015) "Neural dynamics for landmark orientation and angular path integration" *Nature* 521, 186 -191

Küffner, R., Zach, N., Norel, R., Hawe, J., Schoenfeld, D., Wang, L., Li, G., Fang, L., Mackey, L., Hardiman, O., Cudkowicz, M., Sherman, A., Ertaylan, G., Grosse-Wentrup, M., Hothorn, T., van Ligteneberg, J., Macke, J.H., Meyer, T., Schölkopf, B., Tran, L., Vaughan, R., Stolovitzky, G. & Leitner, M.L. (2015) "Crowdsourced analysis of clinical trial data to predict amyotrophic lateral sclerosis progression" *Nat. Biotech.* 33, 51 - 57

Kühn, S., Erdmann, C., Block, J., Schwenkmezger, L., Steffen, A., Rottner, K. & Geyer, M. (2015) "The structure of FMNL2–Cdc42 yields insights into the mechanism of lamellipodia and filopodia formation" *Nat. Comm.* 6, 7088

Kulbida, R., Wang, Y., Mandelkow, E.-M., Schoch, S., Becker, A.J. & van Loo, K.M.J. (2015) "Molecular imaging reveals epileptogenic Ca²⁺-channel promoter activation in hippocampi of living mice" *Brain. Struct. Funct.* 220, 3067 - 3073

Lu, C.-H., Ceconello, A., Oi, X.-J., Wu, N., Jester, S.-S., Famulok, M., Matthies, M., Schmidt, T.-L. & Willner, I. (2015) "Switchable Reconfiguration of a seven-ring inter-locked DNA catenane nanostructure" *Nano Lett.* 15, 7133 - 7137

Mangino, G., Famiglietti, M., Capone, C., Veroni, C., Percario, Z.A., Leone, S., Fiorucci, G., Löff, S., Romeo, G., Agresti, C., Persichini, T., Geyer, M. & Affabris, E. (2015) „HIV-1 myristoylated nef treatment of murine microglial cells activates inducible nitric oxide synthase, NO₂ production and neurotoxic activity" *PLoS One* 10, e0130189

Pickardt, M., Neumann, T., Schwizer, D., Callaway, K., Vendruscolo, M., Schenk, D., George-Hyslop, P.S., Mandelkow, E.-M., Dobson, C.M., McConlogue, L., Mandelkow, E. & Toth, G. (2015) "Identification of small molecule inhibitors of tau aggregation by targeting monomeric tau as a potential therapeutic approach for tauopathies" *Curr. Alzheimer. Res.* 12, 814 - 828

Raju, D., Schonauer, S., Hamzeh, H., Flynn, K.C., Bradke, F., vom Dorp, K., Dörmann, P. R., Yildiz, Y., Trötschel, C., Poetsch, A., Breiden, B., Sandhoff, K., Körschen, H.G. & Wachten, D. (2015) „Accumulation of Glucosylceramide in the Absence of the Beta-Glucosidase GBA2 Alters Cytoskeletal Dynamics" *PLoS Genet.* 11, e1005063

Royeck, M., Kelly, T., Opitz, T., Otte, D.-M., Rennhack, A., Woitecki, A., Pitsch, J., Becer, A., Schoch, S., Kaupp, U.B., Yaari, Y., Zimmer, A. & Beck, H. (2015) "Downregulation of spermine Augments dendritic persistent sodium currents and synaptic integration after status epilepticus" *J. Neurosci.* 35, 15240 - 15253

Saidi, L.-J., Polydoro, M., Kay, K. R., Sanchez, L., Mandelkow, E.-M., Hyman, B.T. & Spires-Jones, T.L. (2015) "Carboxy terminus heat shock protein 70 interacting protein reduces tau-associated degenerative changes" *J. Alzheimers Dis.* 44, 937 – 947

Scheib, U., Stehfest, K., Gee, C.E., Körschen, H.G., Fudim, R., Oertner, T.G. & Hegemann, P. (2015) "The rhodopsin-guanylyl cyclase of the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii* enables fast optical control of cGMP signaling" *Sci. Signal.* 8, rs8

Schröder, B., Weber, T., Yalunin, S.V., Kiel, T., Matyssek, C., Sivils, M., Schäfer, S., Cube, F. v., Irsen, S., Busch, K., Roper, C. & Linden, S. (2015) "Real-space imaging of nanotip plasmons using electron energy loss spectroscopy" *Phys. Rev. B* 92, 085411
Schwalbe, M., Kadavath, H., Biernat, J., Ozenne, V., Blackledge, M., Mandelkow, E. & Zweckstetter, M. (2015) "Structural impact of tau phosphorylation at threonine 231" *Structure* 23, 1448 – 1458

Seelig, J.D. & Jayaraman, V. (2015) "Neural dynamics for landmark orientation and angular path integration" *Nature* 521, 186 – 191

Shammas, S.L., Garcia, G.A., Kumar, S., Kjaergaard, M., Horrocks, M.H., Shivji, N., Mandelkow, E.-M., Knowles, T.P.J., Mandelkow, E. & Klenerman, D. (2015) "A mechanistic model of tau amyloid aggregation based on direct observation of oligomers" *Nat. Comm.* 6, 7025

Siebek, G., Holik, P., Schmitz, S., Tätzner, S., Thiesler, J. & Steltenkamp, S. (2015) "The development of a μ -biomimetic uncooled IR-Sensor inspired by the infrared receptors of *Melanophila acuminata*" *Bioinspir. Biomi.* 10, 026007

Würtenberger, S. & Groemping, Y. (2015) "A single PXXP motif in the C-terminal region of srGAP3 mediates binding to multiple SH3 domains" *FEBS Lett.* 589, 1156 - 1163

Yamada, K., Patel, T.K., Hochgräfe, K., Mahan, T.E., Jiang, H., Stewart, F.R., Mandelkow, E.-M. & Holtzman, D.M. (2015) "Analysis of in vivo turnover of tau in a mouse model of tauopathy" *Mol. Neurodegener.* 10, 55

Zempel, H. & Mandelkow, E.-M. (2015) "Tau missorting and spastin-induced microtubule disruption in neurodegeneration: Alzheimer Disease and Hereditary Spastic Paraplegia" *Mol. Neurodegener.* 10, 68

Dissertationen

Brückner, M. "Untersuchung und Charakterisierung mikroglialer Funktionen in Mausmodellen der Alzheimer-Erkrankung", Dissertation: Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn (2015)

Fußhöller, D. "The voltage-gated H^+ channel Hv1 and the plasma-membrane Ca^{2+} ATPase PMCA4 in human sperm", Dissertation: Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn (2015)

Jikeli, J. "Sperm navigation in three dimensions", Dissertation: Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität zu Köln (2015)



Personal

Personalstruktur

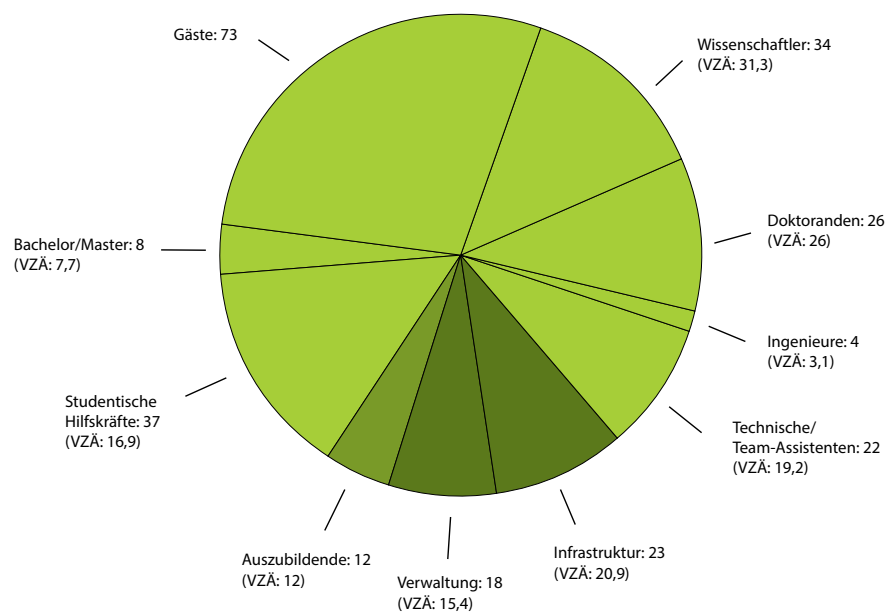
Bei der Stiftung caesar waren zum 1.1.2016 insgesamt 257 Personen beschäftigt (184 caesar-Mitarbeiter/innen und 73 Gastwissenschaftler/innen). Das Vollzeitäquivalent lag bei 225,5 Stellen.

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
1.1.2016:	257 Personen

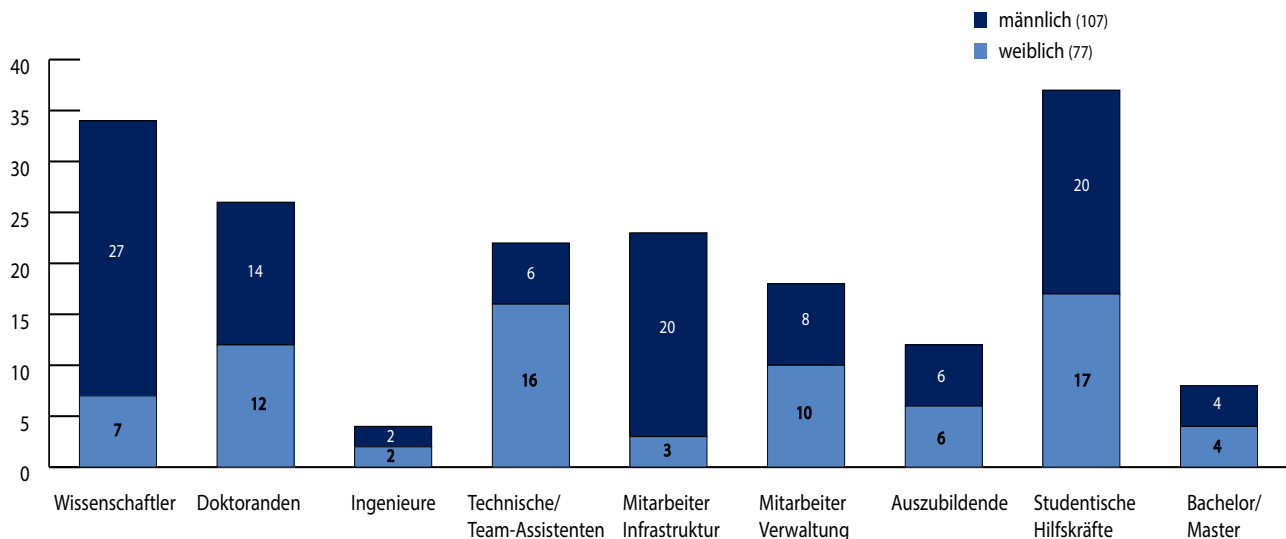
Die Verteilung der Beschäftigten auf die einzelnen Funktionsbereiche ergibt sich aus der unten stehenden Grafik. Danach sind 204 der Beschäftigten im wissenschaftlichen Bereich, 18 in der Verwaltung und 23 in der Infrastruktur beschäftigt. Ferner bildet caesar 12 Auszubildende in sechs Bereichen aus.

Beschäftigte nach Funktionen, Stand: 01.01.2016





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 83. Sie stellen damit fast die Hälfte aller caesar-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	84.595.643 €
Finanzanlagen	301.736.604 €
Sonstige	21.707.176 €
Bilanzsumme	408.039.423 €

Erträge 2015	
Erträge aus Umsatzerlösen und Förderprojekten	3.939.897 €
Erträge aus Wertpapieren und Zinsen	12.741.392 €
Erträge insgesamt	16.681.289 €

Aufwendungen 2015	
Personalaufwand	6.968.916 €
Sachaufwand	5.230.777 €
Abschreibungen	3.966.089 €
Aufwendungen insgesamt	16.165.782 €



Jahresbilanz 2015

Bilanzabschluss zum 31.12.2015 (Angaben in €)

Aktiva	31.12.2015	31.12.2014
A. Anlagevermögen		
I. Immaterielle Vermögensgegenstände	211.734	169.124
II. Sachanlagen		
Grundstücke & Bauten *)	72.362.776	72.362.776
Andere Anlagen	11.739.515	13.405.468
Geleistete Anzahlungen & Anlagen im Bau	493.353	148.752
Summe aus II.	84.595.644	85.916.996
III. Finanzanlagen		
Beteiligungen	330.000	330.000
Wertpapiere des Anlagevermögens zur Anlage des Stiftungsvermögens	290.575.021	291.654.216
Wertpapiere des Anlagevermögens zur Gebäudewiederbeschaffung	10.831.583	10.055.386
Summe aus III.	301.736.604	302.039.602
Summe für A.	386.543.982	388.125.722
B. Umlaufvermögen		
I. Vorräte	249.589	277.856
II. Forderungen und sonstige Vermögensgegenstände		
Forderungen aus Lieferungen und Leistungen	184.040	140.092
Forderungen gegen Unternehmen, mit denen ein Beteiligungsverhältnis besteht	0	233
Sonstige Vermögensgegenstände	1.120.713	1.399.999
Summe aus II.	1.304.753	1.540.324
III. Wertpapiere	1.000.000	9.000.000
IV. Kassenbestand, Bundesbankguthaben, Guthaben bei Kreditinstituten und Schecks	18.666.719	8.469.780
Summe für B.	21.221.061	19.287.960
C. Rechnungsabgrenzungsposten	274.380	200.951
Gesamtes Vermögen	408.039.423	407.614.633

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

Passiva	31.12.2015	31.12.2014
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 Rücklagen gemäß § 58 Nr. 7a AO	6.008.289	5.992.783
Instandhaltungsrücklage *)	4.943.789	4.443.788
Summe aus II.	10.952.078	10.436.571
III. Ergebnis		
Jahresüberschuss/-fehlbetrag	0	0
Summe aus III.	0	0
Summe für A.	402.385.996	401.870.489
B. Sonderposten aus Investitionszuschüssen	4.085.052	4.525.555
C. Rückstellungen	569.369	316.152
D. Verbindlichkeiten		
Verbindlichkeiten aus Lieferungen und Leistungen	783.654	627.177
Sonstige Verbindlichkeiten	201.511	273.976
Summe für D.	985.165	901.153
E. Rechnungsabgrenzungsposten	13.841	1.284
Gesamtes Vermögen	408.039.423	407.614.633

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



Organe der Stiftung

Stiftungsrat

Zum 31.12.2015 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

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. Michael Hoch

Rektor der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

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.

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 Schwill
Max-Planck-Institut für Biochemie

Ashok Sridharan
Oberbürgermeister der Bundesstadt Bonn

Prof. Dr. Heinz Wässle
Max-Planck-Institut für Hirnforschung

Vorstand

Zum 31.12.2015 war der Vorstand wie folgt zusammengesetzt:

Dr. Jason Kerr
Geschäftsführender Direktor
Direktor der Abteilung „Organisation des Gehirns und Verhaltens“

Prof. Dr. Ulrich Benjamin Kaupp
Direktor der Abteilung Molekulare Neurosensorik

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 2015 fanden die folgenden *caesarien* statt:

Prof. Dr. Eberhart Zrenner

Universitätsklinikum Tübingen

„Blinde wieder sehend machen - geht das?“

19.02.2015



Prof. Dr. Markus Gabriel

Universität Bonn

„Warum es die Welt nicht gibt“

26.03.2015



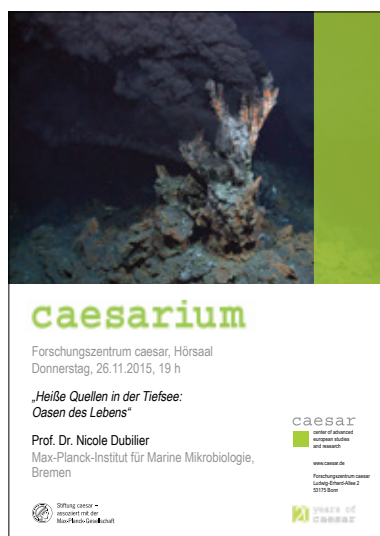


Prof. Dr. U. Benjamin Kaupp

Forschungszentrum caesar

„Betrug in der Wissenschaft - Sündenfall oder Bagatelle?“

28.05.2015



Prof. Dr. Nicole Dubilier

Max-Planck-Institut für Marine Mikrobiologie, Bremen

„Heiße Quellen in der Tiefsee: Oasen des Lebens“

26.11.2015

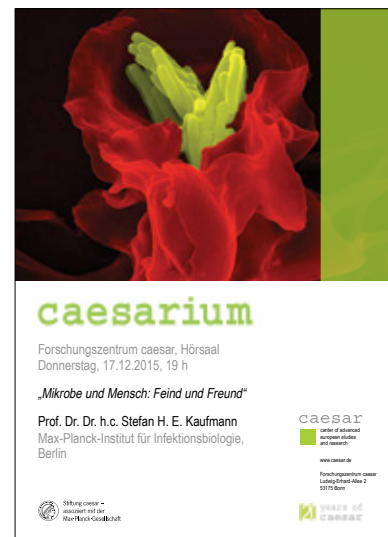


Prof. Dr. Dr. h.c. Stefan H. E. Kaufmann

Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie, Berlin

„Mikrobe und Mensch: Feind und Freund“

17.12.2015





Impressum

Herausgeber

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

Redaktion und Konzept

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

Layout

Stefan Hartmann

© 2016

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>

