

JAHRESBERICHT 2016

ANNUAL REPORT

caesar
center of advanced
european studies
and research



research center caesar
an associate of the
Max Planck Society



Stiftung caesar -
assoziiert mit der
Max-Planck-Gesellschaft

caesar



center of advanced
european studies
and research

Annual Report 2016

Jahresbericht 2016

Table of contents | Inhaltsverzeichnis

Preface Vorwort	6
Research reports Forschungsberichte	10
Behavior and Brain Organization Organisation des Gehirns und Verhaltens Why is the cortex so difficult to understand? Warum ist der Kortex so schwer zu verstehen? <i>Dr. Jason Kerr</i>	12
Molecular Sensory Systems Molekulare Neurosensorik Cut once, please! Fine-tuning the proton channel in sperm Einmal schneiden, bitte! Die Feinabstimmung des Protonenkanals in Spermien <i>Prof. Dr. U. Benjamin Kaupp</i>	24
Molecular Physiology Molekulare Physiologie Gaucher disease – an enigma like the Egyptian Sphinx Morbus Gaucher – ein Rätsel wie die ägyptische Sphinx <i>Prof. Dr. Dagmar Wachten</i>	30
In Silico Brain Sciences Tactile perception in the computer brain Der Tastsinn im Computergehirn <i>Dr. Marcel Oberlaender</i>	40
Neural Circuits Neuronale Schaltkreise How fruit flies navigate Wie Fruchtfliegen navigieren <i>Dr. Johannes Seelig</i>	48
Neural Systems Analysis Neuronale Systemanalyse How artificial neural networks help to understand the brain Wie künstliche neuronale Netze helfen, das Gehirn zu verstehen <i>Dr. Jakob Macke</i>	58
Structural Dynamics of Proteins Strukturelle Dynamik von Proteinen Observing proteins at work Proteine bei der Arbeit beobachtet <i>Dr. Elmar Behrmann</i>	64
Chemical Biology Chemische Biologie Of drugs, transport capsules and nanomachines Von Medikamenten, Transportkapseln und Nanomaschinen <i>Prof. Dr. Michael Famulok</i>	70



IMPRS for Brain and Behavior	76
Publications Publikationen	78
caesar Insight caesar Einblick	82
Work and Family Beruf und Familie	84
Events Veranstaltungen	88
Figures and facts Zahlen und Fakten	90
Personnel Personal	91
Finances Finanzen	93
Annual Balance Sheet Jahresbilanz	94
Foundation bodies Organe der Stiftung	96
Imprint Impressum	98

Preface

In 2016, caesar took a definitive step towards cementing its new scientific direction: Dr. Kevin Briggman was recruited to join caesar as the third scientific director in June 2017.

He was identified as the preferred candidate at a scientific symposium held on November 7th, 2016. Under the topic of "Quantifying the Behaving Brain", seven candidates presented their work to a scientific audience which also comprised the official Max Planck search committee for caesar (the so-called Stammkommission). The expertise of the invited candidates fell into four areas of research, namely behavioral neuroscience, theoretical neuroscience, anatomical reconstruction, and physics-based tool development for neuroscience.

This diversity in the research fields of director candidates is in line with our declared aim to position caesar as a leading behavioral neuroscience institute. Our approach to the core questions of neurobiology is based on studying complex behavior, and we believe that breakthroughs in this area are only possible by bringing into play a wide range of neuroscience sub-disciplines. This interdisciplinary approach is also reflected in the scientific conceptual framework for caesar.

Dr. Kevin Briggman is no newcomer to either the Max Planck Society or to Germany since he worked as a postdoctoral fellow at the Max Planck Institute for Medical Research in Heidelberg from 2005 to 2011.

He joins caesar from the National Institute of Neurological Disorders and Stroke, National Institutes of Health, Bethesda (USA), where he has been heading his own laboratory since 2011. Dr. Briggman works in the field of systems neuroscience and brings his background in engineering, computational neuroscience and experimental neuroscience to bear on fundamental questions of systems neuroscience.

Vorwort

Im Jahr 2016 konnten wir die wissenschaftliche Neuausrichtung von caesar entscheidend voranbringen: Der Amerikaner Dr. Kevin Briggman wurde als dritter wissenschaftlicher Direktor für caesar gewonnen. Er tritt sein Amt im Juni 2017 an.

Am 7. November 2016 fand ein wissenschaftliches Symposium unter dem Titel „Quantifying the Behaving Brain“ statt, bei dem Kevin Briggman als Wunschkandidat identifiziert wurde. Insgesamt sieben Kandidatinnen und Kandidaten stellten ihre Arbeit einem wissenschaftlichen Publikum vor, dem auch die offizielle Findungskommission der Max-Planck-Gesellschaft für caesar (die sogenannte Stammkommission) angehörte. Die Vortragenden deckten insgesamt vier Forschungsrichtungen ab: Verhaltensneurowissenschaften, theoretische Neurowissenschaft, anatomische Rekonstruktion und physikbasierte Werkzeugentwicklung für die Neurowissenschaft.

Dieses vielfältige Themenspektrum bei der Kandidatensuche wird unserem erklärten Ziel gerecht, das Institut als ein führendes Institut der Verhaltensneurowissenschaften zu positionieren. Caesar nähert sich den Kernfragen der Neurobiologie anhand der Untersuchung komplexen Verhaltens. Durchbrüche auf diesem Forschungsgebiet sind aber nur möglich, wenn eine ganze Bandbreite neurowissenschaftlicher Unterdisziplinen berücksichtigt wird. Entsprechend disziplinübergreifend wurde auch das Entwicklungskonzept für caesar formuliert.

Für Dr. Briggman sind Deutschland und die Max-Planck-Gesellschaft bereits vertrautes Terrain: Von 2005 bis 2011 war er Postdoktorand am Max-Planck-Institut für medizinische Forschung in Heidelberg. Danach gründete er am National Institute of Neurological Disorders and Stroke, National Institutes of Health in Bethesda (USA) seine eigene Forschungsgruppe. Kevin Briggman wendet seine Kenntnisse in den Ingenieurs-, Computer- und experimentellen Neurowissen-

He has been at the forefront of a number of experimental and analytical techniques that have become standard in the analysis of how circuits in the nervous system control animal behavior, including the analysis of large-scale neural population dynamics and large-scale anatomical reconstruction of brain wiring. His overarching goal is to fully understand the computational underpinnings of the neural circuitry that drives an animal's behavior.

This recruitment will further enrich the scientific landscape at caesar and provide new opportunities for collaboration within the institute, the Max Planck Society, and the regional research community.

2016 also represents the first full year of operation for the International Max Planck Research School (IMPRS) for Brain and Behavior. During this period, the Teaching Committee finalized the curriculum concept which is comprised of theoretical and practical training in advanced neuroscience techniques. An "IMPRS Student Handbook" as well as a comprehensive Ph.D Timeline Overview with specific milestones for the three-year structured academic program were approved by the Steering Committee. The selection of candidates took place in March, and the academic program for the IMPRS inaugural class was launched with an intensive two-week Summer School held at caesar from August 29th through September 10th, 2016. It combined lectures and lab experience in the latest techniques in electrophysiology, microscopy, and optics, provided by a group of internationally renowned neuroscientists.

To sum it up, 2016 proved to be an outstanding year for caesar and we are already well into the planning for 2017, where, in order to keep up the envisaged goal of three scientific departments, caesar will resume the director search process to fill the position that will become vacant when Prof. Kaupp transfers his department into an emeritus group. When all director positions are filled and the new directors are fully on board,

schaften auf grundlegende Fragen der Systemneurowissenschaften an. Er war maßgeblich an der Entwicklung verschiedener experimenteller und analytischer Verfahren beteiligt, die sich als Standardwerkzeuge bei der Analyse von Schaltungen im Nervensystem als Grundlage von Tierverhalten etabliert haben; dazu zählen die Analyse der Dynamik von großen neuronalen Populationen und die umfangreiche anatomische Rekonstruktion von neuronalen Schaltkreisen. Sein übergreifendes Ziel ist es, vollständig zu verstehen, welche Berechnungen in neuronalen Schaltkreisen für beobachtbares tierisches Verhalten verantwortlich sind.

Seine Berufung wird das Forschungsspektrum bei caesar erweitern und neue Möglichkeiten der Zusammenarbeit am Institut, in der Max-Planck-Gesellschaft und im regionalen Wissenschaftsraum eröffnen.

Für die International Max Planck Research School (IMPRS) for Brain and Behavior war 2016 das erste vollständige Arbeitsjahr. Es wurde ein Lehrkonzept erarbeitet, das theoretische und praktische Kenntnisse in fortgeschrittenen neurowissenschaftlichen Verfahren vermitteln soll. Der Lenkungsausschuss verabschiedete einen „Leitfaden für IMPRS-Studierende“ und einen detaillierten Promotionszeitplan mit konkreten Meilensteinen für ein dreijähriges, strukturiertes akademisches Programm. Die Auswahl der Kandidatinnen und Kandidaten erfolgte im März, und vom 29. August bis zum 10. September 2016 fand ein Intensivkurs bei caesar statt, der den offiziellen Startschuss für die Doktoranden des ersten IMPRS-Jahrgangs markierte. Durchgeführt von einer Gruppe international anerkannter Neurowissenschaftler, wechselten sich dabei Vorlesungen mit praktischer Laborarbeit unter Einsatz modernster Elektrophysiologie-, Mikroskopie- und optischer Techniken ab.

Das letzte Jahr war also von herausragender Bedeutung für caesar und die Planungen für 2017 sind in vollem Gange. Mit der dann anstehenden

caesar will become an even more vibrant and outstanding institute to conduct curiosity-driven research in the behavioral neurosciences.

Emeritierung von Prof. Kaupp gilt es eine weitere Direktorenstelle zu besetzen, um die Zielgröße von drei wissenschaftlichen Abteilungen aufrechtzuerhalten. Ist dieses Ziel erreicht, wird caesar als ein führendes Institut der Verhaltensneurowissenschaften, an dem neugiergetriebene Forschung auf höchstem Niveau stattfindet, weiter an Strahlkraft gewinnen.



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

Prof. Dr. Martin Stratmann
President of the Max Planck Society / Präsident der Max-Planck-Gesellschaft
Chairman of the Foundation Board / Vorsitzender des Stiftungsrates



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

Dr. Jason Kerr
Managing Director / Geschäftsführender Direktor



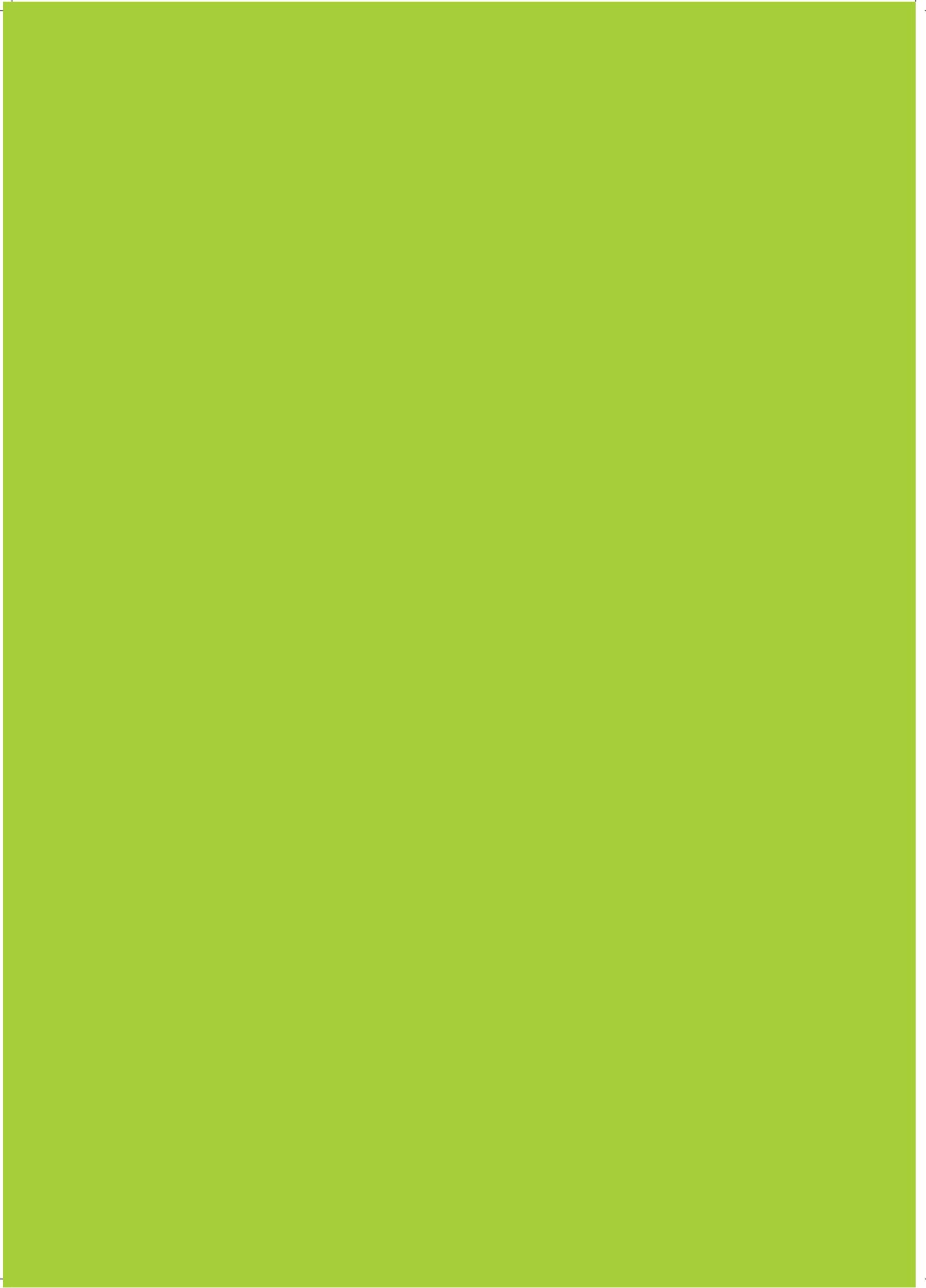
A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'U. B. Kaupp'.

Prof. Dr. U. Benjamin Kaupp
Director / Direktor



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

Gertrud Bilski
Administrative Director / Kaufmännische Geschäftsführerin



Research reports
Forschungsberichte



Why is the cortex so difficult to understand?

Jason Kerr | Department of Behavior and Brain Organization

Over the past one hundred years of neuroscience many theories have attempted to provide a neurophysiological framework for understanding animal behavior. One of the most influential theories, and yet to be tested, was published by Donald Hebb in "The Organization of Behavior: A Neuropsychological Theory (1949)." In his book, Hebb made one of the first attempts to build a theory of behavior based on neurophysiological principles that allowed some form of mechanistic explanation, given what was known at the time [1].

Warum ist der Kortex so schwer zu verstehen?

Im Laufe der letzten hundert Jahre wurde in der Neurowissenschaft anhand zahlreicher Theorien versucht, einen neurophysiologischen Rahmen für das Verständnis tierischen Verhaltens zu schaffen. Eine der einflussreichsten Theorien wurde von Donald Hebb in "The Organization of Behavior: A Neuropsychological Theory (1949)" veröffentlicht und wird nach wie vor auf ihre Gültigkeit überprüft. In seinem Buch unternahm Hebb erstmals den Versuch, auf Grundlage neurophysiologischer Prinzipien eine Theorie des Verhaltens aufzustellen, die

He proposed a theory through which simple percepts may be generated by the activity of groups of neurons, which he termed cell assemblies. Neurons form cell assemblies through their connections, with each neuron a member of multiple assemblies and therefore involved in multiple computations. In order for this to occur, neurons can leave and join cell assemblies presumably using activity-based synaptic plasticity rules or structural plasticity. Each cell assembly was said to form a closed loop circuit for a brief period of time in order to carry out a task or form a percept. Hebb further postulated that several such assemblies, activated in sequence, form a phase sequence that is the core neuronal representation of a stimulus percept.

This idea was not born in isolation as the majority of neurophysiological recordings that informed the theory were performed in the whole animal with the aim of relating findings back to behavior [2, 3]. This idea of a spatially distributed neuronal assembly made two important predictions: 1) For a given perceptual task, the exact same neurons might not be activated on a trial by trial basis, but a 'core of neurons' which are absolutely necessary for the outcome of each trial, are activated from one trial to the next. 2) The spatial proximity of pairs of neurons does not imply membership to the same functional assembly, and the neuronal members of assemblies may be anatomically widely distributed.

Testing this or any comparable theory requires accurate measurement of the activity of members of the assemblies. There are two central problems in achieving this. First, although it is more than likely that a stimulus detectable by an animal is encoded by a population of neurons, identifying the exact neurons that are used by the animal for the detection is an exceptionally challenging task. Second, as a cell assembly has been defined as neurons firing action potentials (APs) in some order that can be used for a detection-based decision, the challenge is to separate ongoing activity from decision-related firing on a trial by trial basis.

eine Art mechanistischer Erklärung entsprechend dem damaligen Wissensstand bot [1]. Er stellte eine Theorie auf, nach der einfache Wahrnehmungen durch die Aktivität von Neuronengruppen generiert werden, die er als Zellverbände bezeichnete. Neuronen bilden Zellverbände mittels ihrer Verknüpfungen, wobei jedes Neuron mehreren Verbänden angehört und daher in multiple Informationsverarbeitungsprozesse eingebunden ist. Zu diesem Zweck können Neuronen vermutlich aufgrund aktivitätsbasierter synaptischer Plastizitätsregeln oder struktureller Plastizität aus Zellverbänden austreten und sich ihnen anschließen. Jeder Zellverband würde für kurze Zeit einen geschlossenen Regelkreis bilden, um eine Aufgabe durchzuführen oder eine Wahrnehmung zu generieren. Weiterhin postulierte Hebb, dass mehrere solche Verbände bei aufeinander folgender Aktivierung eine Phasensequenz bilden, welche die zentrale neuronale Abbildung einer Reizwahrnehmung darstellt.

Diese Vorstellung entwickelte Hebb keineswegs zusammenhanglos: Der Großteil der neurophysiologischen Aufzeichnungen, auf denen die Theorie fußte, war am kompletten Tier erfolgt, mit dem Ziel, die Ergebnisse mit dem Verhalten in Beziehung zu setzen [2, 3]. Das Konzept eines räumlich verteilten Neuronenverbands führte zu zwei wichtigen Vorhersagen: 1) Obgleich möglicherweise für eine bestimmte Wahrnehmungsaufgabe nicht bei jedem Versuch genau dieselben Neuronen aktiviert werden, erfolgt doch jeweils die Aktivierung einer 'Kerngruppe von Neuronen', die für das Ergebnis der einzelnen Versuche absolut notwendig ist. 2) Die räumliche Nähe von Neuronenpaaren bedeutet nicht, dass sie demselben funktionellen Verband angehören, und die neuronalen Elemente der Verbände können anatomisch weit verstreut sein.

Um diese oder eine vergleichbare Theorie zu überprüfen, ist eine exakte Messung der Aktivität der einzelnen Elemente von Zellverbänden erforderlich. Dabei treten zwei zentrale Probleme auf. Erstens ist die Identifizierung der genauen Neuronen, die das Tier für die Erkennung einsetzt – auch wenn es mehr als wahrscheinlich ist, dass ein von einem

This second issue raises an important point as individual neurons could be members of many assemblies and the firing of an AP in a neuron will only imply assembly membership. Further, since it is not clear what model best describes activity propagation within functional assemblies, and since correlated AP firing between neurons does not prove connectivity, obtaining the complete wiring diagram will be of great importance in understanding the functional assembly.

A game of numbers: seeing all you can see

A central issue that still needs to be addressed is how many neurons need to be simultaneously recorded from to detect a functional neuronal assembly? Is it enough to look for signatures of functional neuronal assemblies in the absence of recordings from massive numbers of neurons? Are neuronal assemblies sufficiently stable for multiple serial recordings of neuronal populations from the different layers of cortex to be used to identify the membership in the same assemblies?

One method which allows neuronal activity to be recorded from relatively large populations of neurons is multiphoton imaging. In this technique a laser is rapidly scanned across neurons deep within the brain to create a video sequence showing changes in neurons' brightness over time. By loading fluorescent calcium (Ca^{2+}) sensors into the neurons, the brightness of each neuron becomes dependent on the concentration of the calcium ions it contains. When an AP occurs in a neuron, the electrical impulse opens voltage sensitive, calcium-permeable channels in the cell membrane, calcium flows in and the neuron's brightness increases (Figure 1a). One of the key advantages of this technique is that it allows unambiguous assignment of recorded activity to individual neurons while also allowing for the functional data to be directly compared to anatomical reconstructions after the experiment. With the increasing availability of dense electron microscopic reconstruction, this can also allow the functional data to be compared to the connectivity 'circuit diagram' of the imaged region.

Tier erkannter Reiz durch eine Neuronenpopulation kodiert wird – eine außergewöhnlich schwierige Aufgabe. Zweitens liegt die Herausforderung darin, bei jedem Versuch zwischen kontinuierlicher Aktivität und entscheidungsbedingter Aktivität zu unterscheiden, da ein Zellverband definitionsgemäß aus Neuronen besteht, die Aktionspotentiale (APs) in einer Abfolge aussenden, die für eine erkenntnisbasierte Entscheidung genutzt werden kann. Dieses zweite Problem greift einen wichtigen Punkt auf, da einzelne Neuronen vielen Verbänden angehören können und die Generierung eines AP in einem Neuron lediglich ein Hinweis auf die Zugehörigkeit zu einem Verband ist. Darüber hinaus ist für das Verständnis eines funktionellen Verbandes die Kenntnis des vollständigen Schaltplans von großer Bedeutung, da nicht klar ist, welches Modell die Aktivitätsausbreitung innerhalb funktioneller Verbände am besten beschreibt, und die korrelierte Aussendung von APs zwischen Neuronen keine Konnektivität beweist.

Ein Zahlenspiel: alles sehen, was man sehen kann

Ein wesentlicher Punkt, der noch zu klären ist, ist die Frage, von wie vielen Neuronen gleichzeitig abgeleitet werden muss, um einen funktionellen Neuronenverband nachzuweisen. Genügt es, nach Signaturen funktioneller Verbände zu suchen, obwohl gar nicht von einer enorm großen Neuronenzahl abgeleitet wird? Sind neuronale Verbände ausreichend stabil, um durch mehrfache Serienmessung der Aktivität neuronaler Populationen in den verschiedenen Schichten des Kortex die Zugehörigkeit zu denselben Verbänden zu ermitteln?

Ein Verfahren, das die Erfassung der neuronalen Aktivität relativ großer Neuronenpopulationen erlaubt, ist die Multiphotonen-Bildgebung. Dabei werden Neuronen tief im Inneren des Gehirns mit großer Geschwindigkeit mit einem Laser abgetastet, um eine Videosequenz zu erzeugen, die Veränderungen der Helligkeit der Neuronen im Zeitverlauf darstellt. Das Einschleusen fluoreszierender Kalzium (Ca^{2+})-Sensoren in die Neuronen führt dazu, dass sich die Helligkeit der einzelnen Neuronen mit der Konzentration der in ihnen ent-

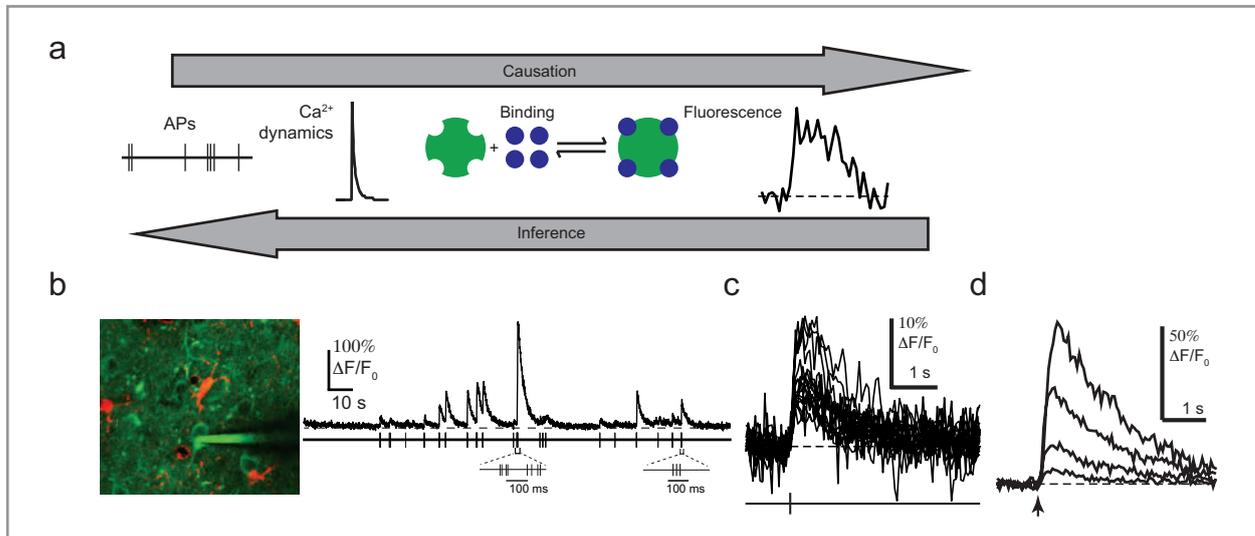


Figure 1. a. AP discharge, calcium kinetics, binding transitions and fluorescence are linked by a causal biophysical model (left to right) and inference procedures (right to left).
b. Two-photon image (left) of neuronal population expressing GCaMP6s (green) in L2/3 of mouse V1, with astrocytes stained using SR101 (red) and electrical recording of APs in a single neuron. Simultaneous electrical recording of AP times and imaging of neuronal fluorescence (right).
c. Average fluorescence evoked by isolated single APs for 18 neurons.
d. Average fluorescence evoked by single APs and bursts of 2, 3 and 4 APs in a L2/3 mouse V1 neuron.

Abbildung 1. a. AP-Entladung, Kalziumkinetik, Bindungsübergänge und Fluoreszenz werden durch ein kausales biophysikalisches Modell (von links nach rechts) und Inferenzverfahren (von rechts nach links) verknüpft.
b. Zwei-Photonen-Aufnahme (links) einer GCaMP6s exprimierenden neuronalen Population in L2/3 des Maus-V1 (grün), wobei die Astrozyten mit SR101 angefärbt sind (rot) und APs in einem einzelnen Neuron elektrisch aufgezeichnet werden. Simultane elektrische Aufzeichnung von AP-Zeitpunkten und Bildgebung der neuronalen Fluoreszenz (rechts).
c. Durch isolierte einzelne APs evozierte durchschnittliche Fluoreszenz für 18 Neuronen.
d. Durch einzelne APs und Bursts von 2, 3 und 4 APs in L2/3 eines Mäuse-V1-Neurons evozierte durchschnittliche Fluoreszenz.

The rise of the bumps

One of the central obstacles that must be overcome in order to be able to use multiphoton imaging data for studying brain function is inferring from the Ca²⁺-imaging data the pattern of AP discharge occurring in the neurons which gave rise to the Ca²⁺-indicator fluorescence changes. The initial development of multiphoton imaging for this purpose used organic dyes as fluorescent Ca²⁺-indicators. These dyes brightly label neurons in the brain area of interest, with increases in the brightness of the dye-filled neurons resulting from the discharge of APs. Simultaneous recording of indicator fluores-

haltenen Kalziumionen verändert. Entsteht in einem Neuron ein AP, öffnet der elektrische Impuls spannungsempfindliche, kalziumdurchlässige Kanäle in der Zellmembran, Kalzium strömt ein und die Helligkeit des Neurons nimmt zu (Abbildung 1a). Einer der wichtigsten Vorteile dieser Technik ist, dass sie die eindeutige Zuordnung der aufgezeichneten Aktivität zu einzelnen Neuronen und gleichzeitig einen direkten Vergleich der funktionellen Daten mit den anatomischen Rekonstruktionen nach dem Experiment ermöglicht. Mit zunehmender Verfügbarkeit der dichten elektronenmikroskopischen Rekonstruktion erlaubt dies auch den Ver-

cence and the electrical activity of a dye-filled neuron using conventional electrophysiological techniques allowed the relationship between fluorescence changes and AP generation to be accurately determined [4], which in turn provides a calibration for using the multiphoton-imaging data alone for quantification of electrical activity in populations of labelled neurons. One major advantage of these organic dyes was that they were found to show a tight, linear relationship between fluorescence changes and AP generation that was consistent across neurons of the same cell type [4]. The rapid binding kinetics of the dyes justified an equilibrium approximation to describe Ca^{2+} binding to the dye molecules [5], resulting in fluorescence increasing instantly after each AP before decaying exponentially back to its baseline value. Linear deconvolution methods could in this case be reliably used to determine AP times from fluorescence recordings [4, 6, 7]. However, these dyes have the major drawback that only single imaging sessions are possible, because the dye is removed from the neurons over a period of about four hours.

This limitation to only a single imaging session has been eliminated in the last few years by the refinement of genetically encoded Ca^{2+} indicators (GECIs) (Figure 1b). The most recent GECIs allow repeated imaging over periods up to several months and are sensitive enough for detection of the vast majority of APs in the labelled neurons. However, simultaneous multiphoton imaging and electrophysiological data acquired in our Department has shown firstly that the amplitudes and kinetics of Ca^{2+} transients vary substantially between different labelled neurons (Figure 1c) and that there is no linear relationship between Ca^{2+} transient characteristics and the number of underlying APs (Figure 1d). This has the effect that the previously developed linear methods fail to accurately infer APs from the multiphoton data.

We set out to measure and model the biophysical processes linking APs to neurons' brightness changes, focusing on the most sensitive protein-based sensor GCaMP6s. These processes include

gleich der funktionellen Daten mit dem 'Schaltplan' der Verknüpfungen in der dargestellten Region.

Fluoreszenzanstieg: Was steckt dahinter?

Eines der zentralen Hindernisse, die überwunden werden müssen, um die Multiphotonen-Bildgebungsdaten zur Untersuchung der Gehirnfunktion nutzen zu können, ist herauszufinden, welches genaue Muster der AP-Entladung in den Neuronen zu den gemessenen Fluoreszenzänderungen des Ca^{2+} -Indikators geführt hat. Bei der ursprünglichen Entwicklung der Multiphotonen-Bildgebung für diesen Zweck wurden organische Farbstoffe als fluoreszierende Ca^{2+} -Indikatoren verwendet. Mit diesen Farbstoffen lassen sich Neuronen in dem zu untersuchenden Hirnareal hell markieren, wobei der Anstieg der Helligkeit der farbstoffgefüllten Neuronen aus der AP-Entladung resultiert. Eine gleichzeitige Aufzeichnung der Indikatorfluoreszenz und der elektrischen Aktivität eines mit Farbstoff gefüllten Neurons mittels herkömmlicher elektrophysiologischer Verfahren ermöglichte die genaue Bestimmung der Beziehung zwischen den Fluoreszenzveränderungen und der AP-Generierung [4], was wiederum eine Kalibrierung erlaubt, so dass durch alleinige Verwendung der Multiphotonen-Bildgebungsdaten eine Quantifizierung der elektrischen Aktivität in markierten Neuronenpopulationen möglich ist. Ein Hauptvorteil dieser organischen Farbstoffe war, dass sie eine straffe, lineare und für Neuronen desselben Zelltyps konsistente Beziehung zwischen Fluoreszenzveränderungen und AP-Erzeugung aufwiesen [4]. Die schnelle Bindungskinetik der Farbstoffe rechtfertigte eine Gleichgewichtsnäherung zur Beschreibung der Ca^{2+} -Bindung an die Farbstoffmoleküle [5], die dazu führte, dass die Fluoreszenz nach jedem AP unmittelbar anstieg, bevor sie exponentiell auf ihren Ausgangswert zurückfiel. In diesem Fall konnten die AP-Zeitpunkte zuverlässig mittels linearer Dekonvolutionsverfahren aus Fluoreszenzaufzeichnungen ermittelt werden [4, 6, 7]. Diese Farbstoffe haben jedoch den entscheidenden Nachteil, dass jeweils nur eine Aufnahmesitzung möglich ist, da der Farbstoff sich innerhalb von ca. vier Stunden abbaut.

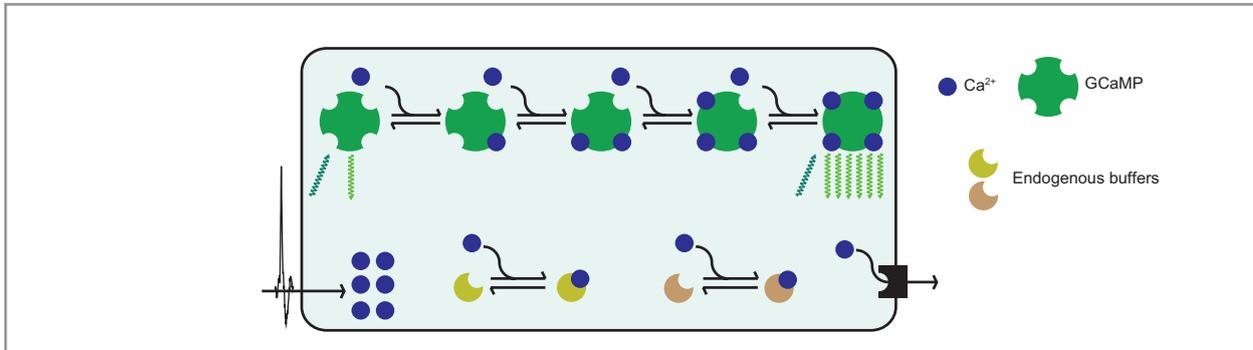


Figure 2. Illustration of biophysical model showing AP-evoked calcium influx, binding to GCaMP6s and endogenous buffers, fluorescence excitation and Michaelis-Menten extrusion mechanism.

Abbildung 2. Illustration eines biophysikalischen Modells, das den AP-evozierten Kalziumeinstrom, die Bindung an GCaMP6s und endogene Puffer, die Fluoreszenzanregung und den Michaelis-Menten-Extrusionsmechanismus darstellt.

the calcium influx caused by the AP, subsequent clearing of free calcium from the neuron, the four-step binding sequence of calcium ions to the sensor, competition between the sensors and other calcium-binding proteins naturally present in the neurons, and the brightness increase brought about by each binding step (Figure 2). To quantitatively link APs to brightness, we modeled the rates of binding and unbinding of calcium ions to the sensor over time, based on the concentration of each of the sensor's binding states, the concentration of free calcium, and kinetic rate constants describing the speed of each binding and unbinding step. Determining the rate constants for GCaMP6s and natural calcium buffers as well as describing calcium flow into and out of the neuron is difficult, as this requires fitting a complex, detailed model with many parameters. One way of dealing with this complex problem is to use a highly simplified phenomenological model [8], while another option is simply to ignore the specific mechanisms involved and train an artificial neural network to guess AP times from brightness changes over time [9]. However, neither method has produced accurate AP sequences when checked using simultaneous optical and electrical recordings in single neurons. In particular, variable responses across neurons present a particularly difficult challenge for methods not based on a causal physical understanding of the data, as it

Diese Beschränkung auf nur eine bildgebende Untersuchung wurde in den letzten Jahren durch eine Verbesserung der genetisch kodierten Ca²⁺-Indikatoren aufgehoben (Abbildung 1b). Die neuesten dieser Indikatoren ermöglichen wiederholte Aufnahmevorgänge über Zeiträume von bis zu mehreren Monaten und sind für den Nachweis der großen Mehrheit der APs in den markierten Neuronen ausreichend empfindlich. In unserer Abteilung erfasste Daten aus gleichzeitig durchgeführten multiphotonenmikroskopischen und elektrophysiologischen Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass zum einen die Amplituden sowie die Kinetik von Ca²⁺-Transienten zwischen den verschiedenen markierten Neuronen erheblich variieren (Abbildung 1c) und zum anderen keine lineare Beziehung zwischen den Eigenschaften der Ca²⁺-Transienten und der Anzahl der zugrunde liegenden APs besteht (Abbildung 1d). Daraus folgt, dass sich mit den zuvor entwickelten linearen Verfahren APs aus den durch Multiphotonen-Bildgebung gewonnenen Daten nicht exakt ableiten lassen.

Wir begannen die biophysikalischen Prozesse, die APs mit den Helligkeitsveränderungen der Neuronen verknüpfen, zu messen und in Modelle zu fassen und konzentrierten uns dabei auf den empfindlichsten proteinbasierten Sensor GCaMP6s. Zu diesen Prozessen gehören der durch das AP bewirk-

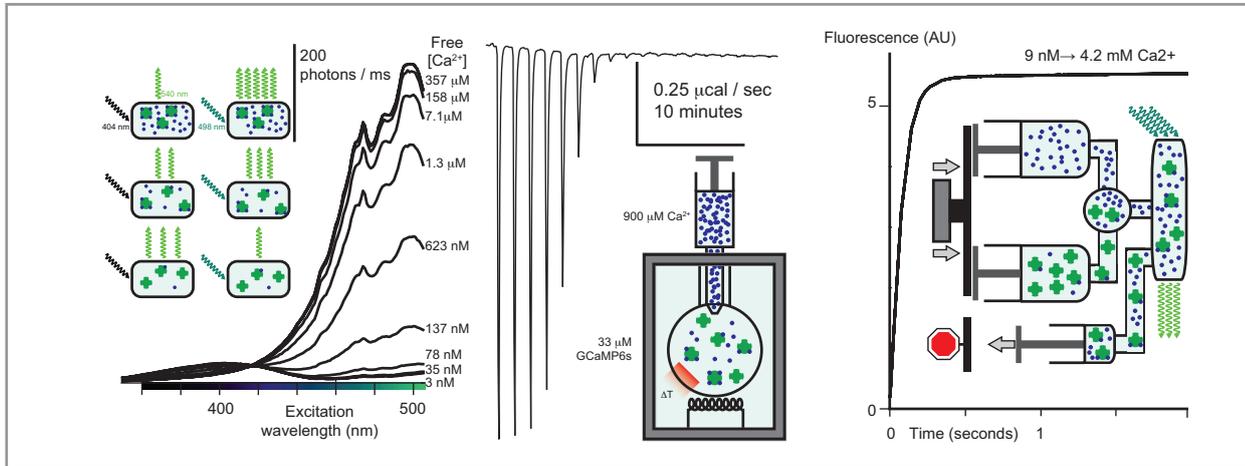


Figure 3. Measurement of Ca²⁺ binding to GCaMP6s using excitation spectroscopy (left), isothermal titration calorimetry (center) and stopped flow fluorescence (right).

Abbildung 3. Messung der Ca²⁺-Bindung an GCaMP6s mittels Anregungsspektroskopie (links), isothermer Titrationskalorimetrie (Mitte) und Stopped-Flow-Fluoreszenz (rechts).

is not clear which parameters should vary across neurons, and which can be fixed for a single cell type or indicator.

Quantifying the brain in action

We developed a new approach based on characterizing the properties of GCaMP6s outside of cells under carefully controlled *in vitro* conditions. After determining the rate constants of GCaMP6s *in vitro*, we arrived at a model of calcium flow through the neuron using combined optical and electrical recordings in the same neurons. We then used additional, held-out recordings to test the accuracy with which our model could determine AP times from a neuron's time-varying brightness.

We measured rate constants for GCaMP6s using three complementary binding assays (Figure 3). To determine how the brightness of the sensor increases with calcium concentration, we measured its fluorescence excitation spectrum as calcium was slowly titrated into the sensor in a spectrometer. To further identify the calcium affinity for binding steps that do not strongly affect the fluorescence, we also measured the heat released as calcium was titrated into the sensor in a calorimeter. To determine the speed of calcium binding, we rapidly mixed the

te Kalziumeinstrom, die nachfolgende Entfernung von freiem Kalzium aus dem Neuron, die in vier Stufen erfolgende Bindung der Kalziumionen an den Sensor, der Wettbewerb zwischen den Sensoren und anderen, in den Neuronen natürlicherweise vorkommenden Kalzium-bindenden Proteinen sowie der durch die einzelnen Bindungsschritte erzeugte Helligkeitsanstieg (Abbildung 2). Um APs quantitativ mit der Helligkeit zu verknüpfen, entwickelten wir ein Modell, das die Geschwindigkeiten der Bindung der Kalziumionen an und der Abspaltung der Kalziumionen von dem Sensor im Zeitverlauf darstellt, basierend auf der Konzentration der einzelnen Bindungsstadien des Sensors, der Konzentration an freiem Kalzium und der kinetischen Geschwindigkeitskonstanten, welche die Geschwindigkeit der einzelnen Bindungs- und Abspaltungsschritte beschreiben. Die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten für GCaMP6s und natürliche Kalziumpuffer sowie die Beschreibung des Einstroms von Kalzium in und des Ausstroms von Kalzium aus dem Neuron sind schwierig, da dies die Anpassung eines komplexen, detaillierten Modells mit zahlreichen Parametern bedeutet. Eine Herangehensweise an dieses komplexe Problem ist die Verwendung eines stark vereinfachten phänomenologischen Modells [8]; eine andere Option

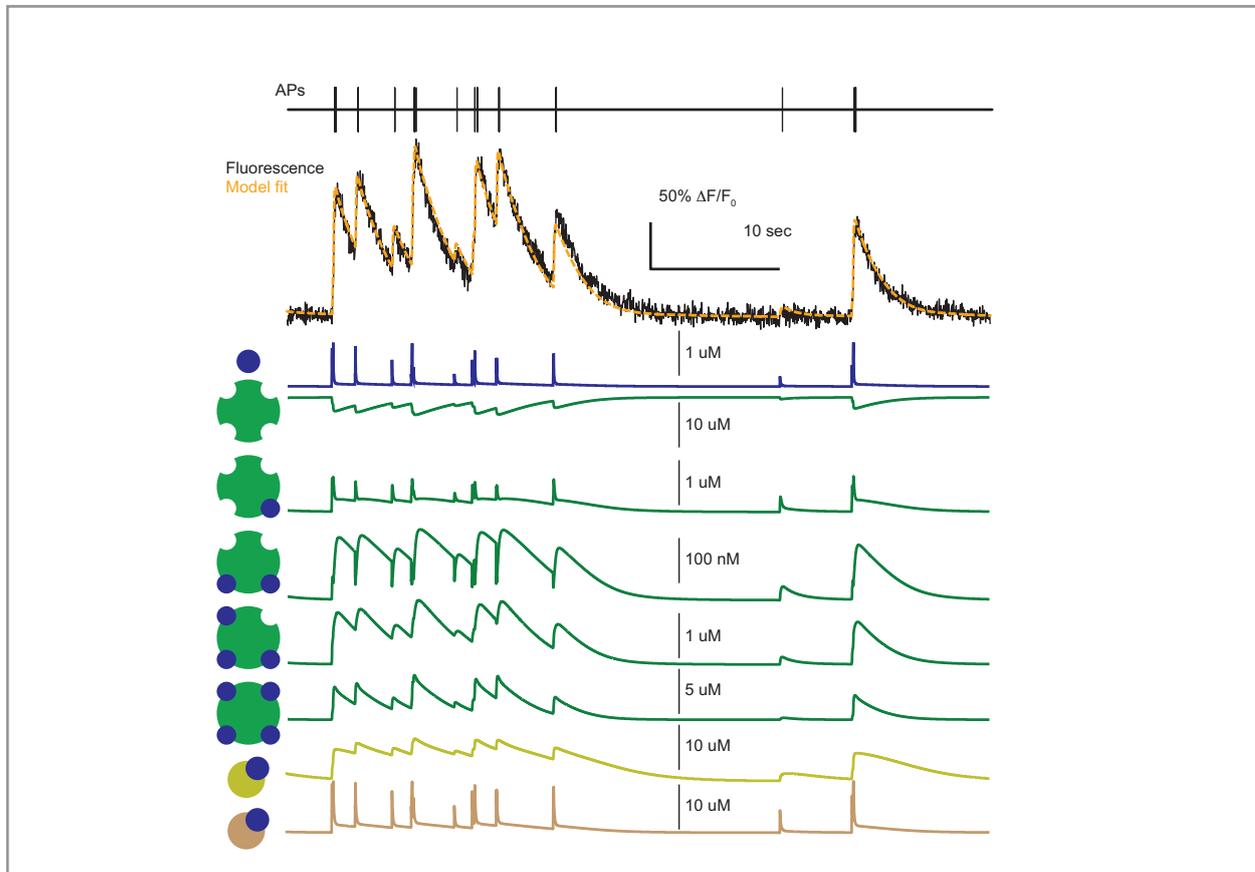


Figure 4. Fit of biophysical model to *in vivo* data, using kinetic rate constants determined *in vitro*.

Abbildung 4. Anpassung des biophysikalischen Modelles an *in vivo*-Daten anhand *in vitro* bestimmter kinetischer Geschwindigkeitskonstanten.

sensor with calcium in a stopped flow mixing device and measured the increase in fluorescence over time. Combining these diverse datasets using newly developed software tools for global fitting of *in vitro* binding assays, we determined rate constants for GCaMP6s that were consistent with all data from these three types of experiments.

Using the rate constants determined *in vitro*, we next examined combined optical and electrical recordings in the same neuron *in vivo* to build an extended model of AP-evoked calcium dynamics in neurons. We modeled the influx of calcium following each AP, binding to the sensor and to naturally occurring buffers and extrusion from the cell as calcium eventually returned to resting levels (Figure 4). By adjusting the biophysical parameters

besteht darin, die daran beteiligten spezifischen Mechanismen einfach zu ignorieren und ein künstliches neuronales Netzwerk darauf zu trainieren, die AP-Zeitpunkte aus den Veränderungen der Helligkeit im Zeitverlauf zu bestimmen [9]. Die Überprüfung anhand simultaner optischer und elektrischer Messungen einzelner Neuronen hat jedoch gezeigt, dass bislang kein Verfahren präzise AP-Sequenzen geliefert hat. Vor allem variable Reaktionen der Neuronen stellen eine besonders schwierige Herausforderung für Verfahren dar, die nicht auf einem kausalen physikalischen Verständnis der Daten beruhen, da nicht klar ist, welche Parameter zwischen den Neuronen variieren sollen und welche für einen einzelnen Zelltyp oder Indikator festgelegt werden können.

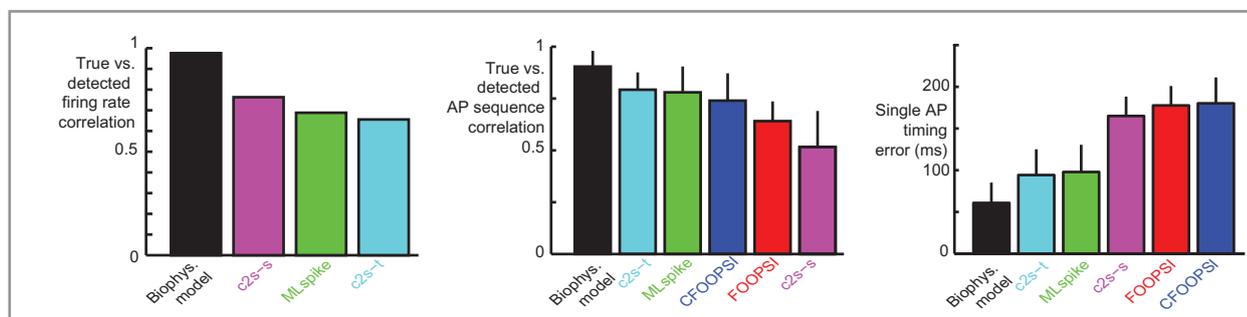


Figure 5. Comparison of AP detection methods, using correlation of true and estimated firing rates (left), true and estimated AP sequences (middle), and timing error of successfully detected isolated single APs (right).

Abbildung 5. Vergleich der AP-Nachweisverfahren anhand der Korrelation echter und geschätzter Feuerraten (links), echter und geschätzter AP-Sequenzen (Mitte) und Fehlerquote bei der Bestimmung des Entladungszeitpunkts bei erfolgreich nachgewiesenen isolierten einzelnen APs (rechts).

of this extended model, including a different total sensor concentration for each neuron, we achieved a tight fit to the fluorescence data and for the first time described calcium binding to a sensor protein both *in vitro* and *in vivo* with the same model. This model captured the most difficult aspects of the AP detection problem, such as the non-linear dependence of the neuron's brightness on the number of APs and the variation in the response across neurons.

To use our biophysical model to detect APs, we employed a statistical technique known as sequential Monte Carlo (SMC). The SMC method generated many candidate AP sequences and compared the predicted fluorescence to the observed brightness of the neuron over time. In an evolution-like process, the simulations inconsistent with the data were discarded while those with accurate predictions were copied and extended forward in time. Using efficient GPU-based algorithms, we were able to explore a broad set of candidate AP sequences to find a sequence consistent with all observed fluorescence measurements.

Analyzing held-out recordings that were not used for model-fitting, we examined the accuracy of our biophysical modeling-based approach compared to several existing AP

Quantifizierung des Gehirns in Aktion

Wir entwickelten einen neuen Ansatz auf der Grundlage der Charakterisierung der Eigenschaften von GCaMP6s außerhalb von Zellen unter sorgfältig kontrollierten *in vitro*-Bedingungen. Nach Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten von GCaMP6s *in vitro* gelangten wir mittels kombinierter optischer und elektrischer Aufzeichnungen eines einzelnen Neurons zu einem Modell des Kalziumstroms durch das Neuron. Im Anschluss prüften wir anhand zusätzlicher Holdout-Aufzeichnungen, mit welcher Genauigkeit unser Modell AP-Zeitpunkte aus der sich mit der Zeit verändernden Helligkeit eines Neurons ermitteln kann.

Die Messung der Geschwindigkeitskonstanten für GCaMP6s erfolgte in drei komplementären Bindungs-Assays (Abbildung 3). Um zu bestimmen, wie die Helligkeit des Sensors mit der Kalziumkonzentration zunimmt, maßen wir während des langsamen Titrierens von Kalzium in den Sensor in einem Spektrometer sein Fluoreszenzanregungsspektrum. Zur weiteren Ermittlung der Kalziumaffinität während der Bindungsschritte, die keinen starken Einfluss auf die Fluoreszenz haben, maßen wir zudem die beim Titrieren von Kalzium in den Sensor freigesetzte Wärme in einem Kalorimeter. Um die Geschwindigkeit der Kalziumbindung zu messen, mischten wir den Sensor nach der Stopped-Flow-Methode zügig mit Kalzium und erfass-

detection methods. We found that our approach provided the most accurate determination of AP sequences from fluorescence measurements, whether considering overall firing rates, the correlation between true and detected APs or the precision of inferred AP times (Figure 5). Our method also exhibited the lowest rate of false positive detections (putative APs when no true AP is present) of all examined approaches.

Our model-based AP detection approach thus provides a more accurate readout of neuronal activity, allowing a quantitative approach to interpreting optically measured neuronal activity. This capability facilitates investigations as to how APs percolate through neuronal circuits to accomplish essential functions of the nervous system. Our approach outperformed existing methods, including deep learning-based “black box” methods, with far greater numbers of free parameters. Because our biophysical model had clear, physical interpretations for each parameter, it was possible to calibrate some parameters *in vitro* and subsequently use these values to predict fluorescence *in vivo*, but this would not have been possible for phenomenological models or generic machine learning methods. These results argue for a rational, first-principles approach incorporating domain-specific knowledge for the analysis of complex biological datasets.

Back to behavior

By allowing long-term quantitative measurement of activity from neuronal populations *in vivo*, the combination of GEICs and biophysical modeling opens up the possibility of searching for and identifying cell assemblies in behaving animals. By using our miniaturized two-photon microscopes for imaging in freely moving animals [10], neural activity giving rise to a wide array of behaviors and percepts can be measured. These experiments can provide a basis for testing the theories first put forward by Hebb regarding the formation, transformation and activation of cell assemblies in behaviors relevant to the animal.

ten den Fluoreszenzanstieg über die Zeit. Durch Kombination dieser verschiedenen Datensätze mittels neu entwickelter Software-Tools zur globalen Anpassung von *in vitro*-Bindungs-Assays bestimmten wir Geschwindigkeitskonstanten für GCaMP6s, die mit sämtlichen Daten dieser drei Versuchsarten in Einklang standen.

Unter Anwendung der *in vitro* bestimmten Geschwindigkeitskonstanten untersuchten wir als Nächstes die kombinierten optischen und elektrischen Aufzeichnungen eines einzelnen Neurons *in vivo*, um ein erweitertes Modell der AP-evozierten Kalziumdynamik in Neuronen zu entwickeln. Dabei berücksichtigten wir den Kalziueinstrom nach jedem AP, die Bindung an den Sensor und die natürlich vorkommenden Puffer sowie die Extrusion aus der Zelle beim schlussendlichen Absinken des Kalziums auf den Ruhewert (Abbildung 4). Durch Anpassung der biophysikalischen Parameter dieses erweiterten Modells, einschließlich einer anderen Gesamtkonzentration des Sensors für jedes Neuron, erzielten wir eine hohe Anpassungsgüte an die Fluoreszenzdaten und beschrieben erstmals die Kalziumbindung an ein Sensorprotein sowohl *in vitro* als auch *in vivo* mit demselben Modell. Dieses Modell erfasste die schwierigsten Aspekte der AP-Detektion, zum Beispiel die nicht-lineare Abhängigkeit der Helligkeit des Neurons von der Anzahl der APs und die Schwankungen in den Reaktionen der unterschiedlichen Neuronen.

Um unser biophysikalisches Modell zum AP-Nachweis einsetzen zu können, wandten wir ein statistisches Verfahren, die sogenannte sequentielle Monte-Carlo-Methode (SMC), an. Mit Hilfe dieser Methode wurden zahlreiche AP-Kandidatensequenzen erzeugt und die vorhergesagte Fluoreszenz mit der beobachteten Helligkeit des Neurons im Zeitverlauf verglichen. In einem evolutionsähnlichen Prozess wurden die mit den Daten nicht übereinstimmenden Simulationen verworfen und solche mit richtigen Vorhersagen kopiert und auf die nächste Zeitebene übertragen. Unter Anwendung wirksamer GPU-basierter Algorithmen konnten wir eine breite Palette an AP-Kandidaten-

sequenzen untersuchen und eine Sequenz finden, die mit allen beobachteten Fluoreszenzmessungen übereinstimmt.

Anhand der Analyse von Holdout-Aufzeichnungen, die nicht für die Modellanpassung verwendet wurden, untersuchten wir die Genauigkeit unseres auf einem biophysikalischen Modell basierenden Ansatzes im Vergleich zu verschiedenen bereits bestehenden AP-Nachweisverfahren. Wir stellten fest, dass unser Ansatz AP-Sequenzen aus Fluoreszenzmessungen am zuverlässigsten nachweisen kann, sei es auf Basis der Gesamtfeuerraten, der Korrelation zwischen echten und detektierten APs oder der Präzision der abgeleiteten AP-Zeiten (Abbildung 5). Unser Verfahren wies zudem die niedrigste Rate von falsch-positiven Nachweisen (vermeintliche APs, wenn kein echtes AP vorlag) aller untersuchten Verfahren auf.

Unser modellbasiertes AP-Nachweisverfahren ermöglicht also ein genaueres Auslesen neuronaler Aktivität und erlaubt so einen quantitativen Ansatz zur Interpretation optisch gemessener neuronaler Aktivität. Dies erleichtert die Untersuchung der Frage, wie APs neuronale Schaltkreise durchlaufen, um wesentliche Funktionen des Nervensystems zu erfüllen. Unser Ansatz übertraf mit seiner sehr viel größeren Anzahl freier Parameter bereits bestehende Methoden, einschließlich der Deep Learning-basierten „Black Box“-Verfahren. Da unser biophysikalisches Modell klare physikalische Interpretationen für jeden Parameter lieferte, konnten einige Parameter *in vitro* kalibriert werden und diese Werte anschließend für die Fluoreszenzvorschau *in vivo* verwendet werden; dies wäre bei phänomenologischen Modellen oder generischen Verfahren des maschinellen Lernens nicht möglich gewesen. Diese Ergebnisse sprechen für einen rationalen, first principles-Ansatz unter Einbezug von domänenspezifischen Kenntnissen für die Analyse komplexer biologischer Datensätze.

Zurück zum Verhalten

Mittels quantitativer Langzeitmessung der Aktivität von Neuronenpopulationen *in vivo* eröffnet die

Kombination von genetisch kodierten Kalziumindikatoren und biophysikalischen Modellen die Möglichkeit, Zellverbände bei sich verhaltenden Tieren aufzuspüren und zu identifizieren. Durch Einsatz unserer miniaturisierten Zwei-Photonen-Mikroskope zur Bildgebung bei sich frei bewegenden Tieren [10] lässt sich die neuronale Aktivität, die eine breite Palette an Verhaltensweisen und Wahrnehmungen hervorruft, messen. Diese Experimente können eine Grundlage für die Überprüfung der erstmals von Hebb vorgeschlagenen Theorien zur Entstehung, Transformation und Aktivierung von Zellverbänden bei für das Tier relevanten Verhaltensweisen bilden.

Contact | Kontakt

Dr. Jason Kerr
Scientific Director
Department Behavior and Brain Organization
Phone +49 (0)228 9656-103
jason.kerr@caesar.de

References | Literaturhinweise

- [1] Wallace, D.J., and Kerr, J.N. (2010) "Chasing the cell assembly" *Curr. Opin. Neurobiol.*
- [2] Creed, R.S., Denny-Brown, D.E., Eccles, J.C., Liddell, E.G.T., and Sherrington, C.S. (1932) "Reflex Activity of the spinal chord" (London: Oxford University)
- [3] Sherrington, C.S. (1906). *The integrative action of the nervous system*, (New York: C Scribner's sons)
- [4] Kerr, J.N., Greenberg, D., and Helmchen, F. (2005) "Imaging input and output of neocortical networks *in vivo*" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 14063-14068
- [5] Helmchen, F., Imoto, K., and Sakmann, B. (1996) "Ca²⁺ buffering and action potential-evoked Ca²⁺ signaling in dendrites of pyramidal neurons" *Biophysical journal* 70, 1069-1081
- [6] Greenberg, D.S., Houweling, A.R., and Kerr, J.N. (2008) "Population imaging of ongoing neuronal activity in the visual cortex of awake rats" *Nat. Neurosci.* 11, 749-751
- [7] Kerr, J.N., de Kock, C.P., Greenberg, D.S., Bruno, R.M., Sakmann, B., and Helmchen, F. (2007) "Spatial organization of neuronal population responses in layer 2/3 of rat barrel cortex" *J. Neurosci.* 27, 13316-13328
- [8] Deneux, T., Kaszas, A., Szalay, G., Katona, G., Lakner, T., Grinvald, A., Rózsa, B., and Vanzetta, I. (2016) "Accurate spike estimation from noisy calcium signals for ultrafast three-dimensional imaging of large neuronal populations *in vivo*" *Nature communications* 7, 12190
- [9] Theis, L., Berens, P., Froudarakis, E., Reimer, J., Roman-Roson, M., Baden, T., Euler, T., Tolias, A.S., and Bethge, M. (2015) Supervised learning sets benchmark for robust spike detection from calcium imaging signals *bioRxiv*
- [10] Sawinski, J., Wallace, D.J., Greenberg, D.S., Grossmann, S., Denk, W., and Kerr, J.N. (2009) "Visually evoked activity in cortical cells imaged in freely moving animals" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 19557-19562



Cut once, please!

Fine-tuning the proton channel in sperm

U. Benjamin Kaupp | Department of Molecular Sensory Systems

Sperm swim through the female genital tract to fertilize the egg cell. They are propelled by the beating of their tail, the flagellum. In our department, we study the molecular mechanisms that control sperm movement. It has long been known that calcium ions play an important role in sperm motility. If the calcium concentration in sperm is increased, the flagellum beats more strongly and asymmetrically. This change in the beating pattern enables sperm to reach the egg cell. The calcium concentration in human sperm

Einmal schneiden, bitte!

Die Feinabstimmung des Protonenkanals in Spermien

Spermien schwimmen durch den weiblichen Genitaltrakt um die Eizelle zu befruchten. Sie werden vorangetrieben durch den Schlag ihres Schwanzes, des sogenannten Flagellums. In unserer Arbeitsgruppe untersuchen wir die molekularen Mechanismen, die die Spermien-Bewegung steuern. Seit langem ist bekannt, dass Kalziumionen eine wichtige Rolle bei der Spermien-Fortbewegung spielen. Erhöht sich die Kalzium-Konzentration in den Spermien, schlägt das Flagellum stärker und asymmetrischer. Diese

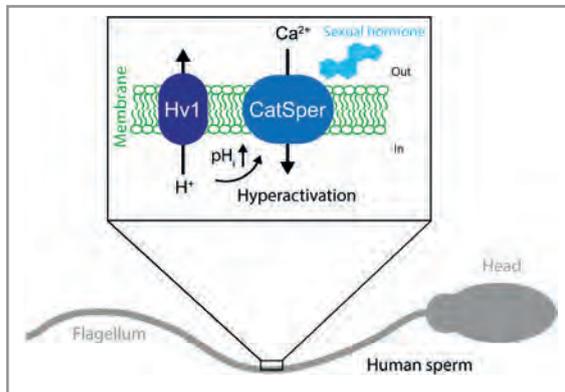


Figure 1. Cartoon of human sperm. Two prominent ion channels in the flagellar membrane are illustrated: the CatSper calcium channel and the Hv1 proton channel. Hv1 regulates the pH value, which in turn regulates CatSper opening, the intracellular calcium concentration, and motility.

Abbildung 1. Schema eines menschlichen Spermiums. Zwei prominente Ionenkanäle in der Flagellenmembran sind dargestellt: der Kalzium-leitende CatSper-Kanal, sowie der Protonen-leitende Hv1-Kanal. Der Hv1-Kanal reguliert den pH-Wert, der seinerseits den CatSper-Kanal reguliert.

is mainly determined by the CatSper calcium channel. CatSper is a protein molecule which forms pores in the membrane of the flagellum that allow calcium ion flux. The CatSper channel can be opened by different stimuli. A natural stimulus is a female sexual hormone, which is produced in the surroundings of the egg cell. We could demonstrate that even minimal concentrations of this sexual hormone can open the CatSper channel in fractions of a second [1]. CatSper is, however, also sensitive to the pH value in sperm. To be more precise: the higher the pH value (i.e. the fewer H⁺ ions, that is protons, present) the more CatSper channel open and calcium ions flow into the flagellum. The Hv1 proton channel [2] is an ion channel in the flagellar membrane that can directly influence the pH value. This channel conducts protons to the outside and could also, by activation of CatSper channels, regulate the calcium concentration and thereby the beating of the flagellum (Figure 1). However, Hv1 only opens under conditions that do

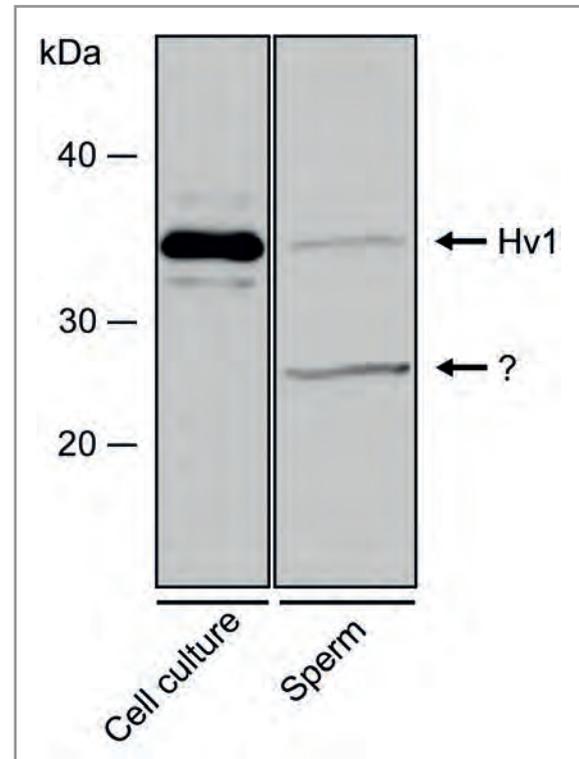


Figure 2. Biochemical detection of the Hv1 channel in a cell culture and in human sperm. An additional, unknown variant exists in sperm.

Abbildung 2. Biochemischer Nachweis des Hv1-Kanals in einer Zellkultur und in menschlichen Spermien. In Spermien gibt es eine weitere, bisher unbekannte Variante.

veränderte Schlagbewegung ist wichtig, um zur Eizelle zu gelangen. Beim Menschen wird die Kalziumkonzentration maßgeblich durch den CatSper-Ionenkanal bestimmt. CatSper ist ein Eiweißmolekül (Protein), das in der Membran des Flagellums Poren bildet durch die Kalziumionen strömen. Der CatSper-Kanal kann durch verschiedene Reize geöffnet werden. Ein natürlicher Reiz ist ein weibliches Sexualhormon, das in der Umgebung der Eizelle produziert wird. Wir konnten zeigen, dass bereits minimale Konzentrationen dieses Sexualhormons den CatSper-Kanal innerhalb von Sekundenbruchteilen öffnen [1]. CatSper reagiert allerdings auch empfindlich auf den pH-Wert im Spermium. Genauer: Je höher der pH-Wert (d.h. je weniger H⁺-Ionen, also Protonen,

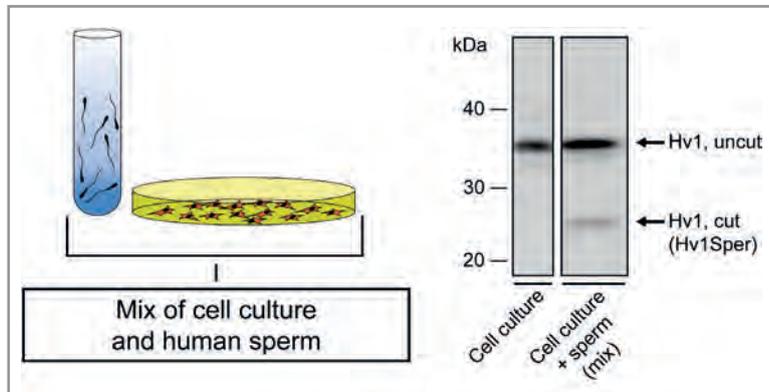


Figure 3. Left: mixing experiment with sperm and a cell culture that produces Hv1. Right: biochemical detection of the short Hv1 variant (Hv1Sper) in the cell culture-sperm mix which indicates the existence of a protease for Hv1 in sperm.

Abbildung 3. Links.: Mischexperiment mit Spermien und einer Zellkultur, die Hv1 herstellt. Rechts: Biochemischer Nachweis der kurzen Hv1-Variante (Hv1Sper) in der Zellkultur-Spermien-Mischung, was für eine Protease für Hv1 in Spermien spricht.

not normally arise in sperm (i.e. at a very positive membrane potential > 0 mV). To solve this mystery, we examined the Hv1 channel in sperm in detail [3].

First, we divided sperm proteins according to their size. Large proteins take longer to migrate in a gel than small proteins, allowing to separate the proteins based on their size. We then made the proton channel protein visible with a specific antibody. What happened next took us by surprise: the antibody recognized not one but two proteins in human sperm. One protein with the expected size of the Hv1 channel and a second, smaller protein (Figure 2). The emergence of Hv1 variants can have different causes: first, many genes exist in different variants; and, second, proteins “mature” after synthesis. This maturing can involve the cutting of proteins with the help of enzymes (proteases). How can those cuts be detected? If sperm have an Hv1-cutting protease, this protease should also be able to cut a complete Hv1 protein from other cells. We devised an experiment to demonstrate this (Figure 3, left): We mixed a cell culture, which produces complete Hv1 protein, with sperm. (The cell culture produces a minimally modified Hv1 protein so that

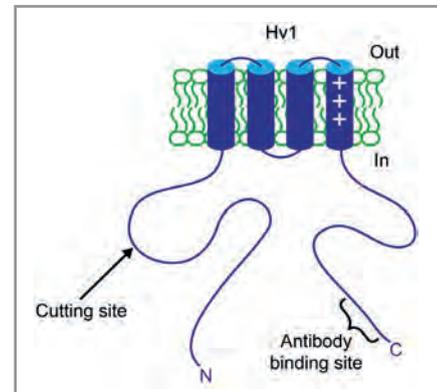


Figure 4. Schematic diagram of the Hv1 channel with the cutting site and the antibody binding site.

Abbildung 4. Cartoon des Hv1 Kanals mit der Schnittstelle sowie der Bindestelle des Antikörpers.

vorhanden sind), desto mehr öffnet CatSper und Kalziumionen strömen ins Flagellum. Ein Ionenkanal in der Flagellenmembran, der den pH-Wert direkt beeinflussen kann, ist der Hv1-Protonenkanal [2]. Dieser Kanal leitet Protonen nach außen und könnte – über die Aktivierung der CatSper-Kanäle – auch die Kalziumkonzentration und somit den Flagellenschlag regulieren (Abbildung 1). Allerdings öffnet Hv1 nur unter Bedingungen (nämlich bei einer sehr positiven Membranspannung > 0 mV), die normalerweise nicht in Spermien vorkommen. Um diesem Rätsel auf den Grund zu gehen, haben wir uns den Hv1-Kanal in Spermien genauer angeschaut [3].

Zunächst trennten wir Spermien-Proteine ihrer Größe nach auf. Große Proteine wandern in einem Gel langsamer als kleine Proteine, so dass sich die Proteine der Größe nach geordnet auftrennen. Danach wurde das Protonenkanal-Protein mit Antikörpern sichtbar gemacht. Hier erlebten wir eine Überraschung: Der Antikörper erkennt in menschlichen Spermien nicht ein, sondern zwei Proteine: ein Protein mit der erwarteten Größe des Hv1-Kanals und zusätzlich ein kleineres

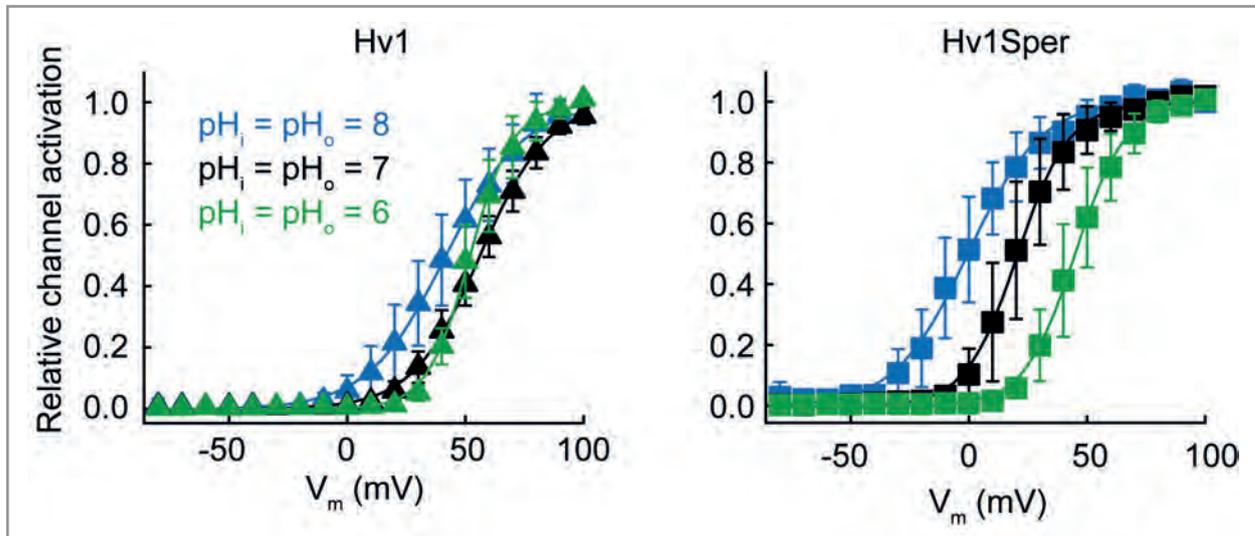


Figure 5. Activation curves of Hv1 (left) and Hv1Sper (right). While Hv1 is activated relatively independently of simultaneous changes in pH ($pH_i = pH_o$), Hv1Sper is already activated further left, at less positive voltages (blue curve).

Abbildung 5. Aktivierungskurven von Hv1 (links) und Hv1Sper (rechts). Während Hv1 relativ unabhängig von gleichzeitigen pH-Änderungen ($pH_i = pH_o$) aktiviert wird, ist Hv1Sper bei hohem pH bereits weiter links, bei weniger positiven Spannungen aktiv (blaue Kurve).

it can be distinguished biochemically from Hv1 from sperm.) The shortened Hv1 variant actually forms in this mix (Figure 3, right). Thus, sperm have a protease that cuts Hv1. Because the new cut variant is specific to sperm, we named it Hv1Sper.

At what location does human sperm cut the Hv1 channel? Further experiments with Hv1 variants of different lengths identified the cutting site: the first 68 of the channel's amino acids are cut off (Figure 4). A far more interesting question is why sperm need a short Hv1 variant. To examine the impact of the cut on channel function, we had Hv1Sper and Hv1 generated separately from each other in frog oocytes and examined them. Using an electrophysiological method, the patch clamp technique, it is possible to measure the minuscule currents that flow through ion channels. Hv1 opens its pores and conducts protons if the membrane potential is positive, i.e. if the inner side of the membrane is positively charged. The voltage dependence can be illustrated with the help of activation curves (Figure 5). The voltage dependence is relatively independent of the pH;

Protein (Abbildung 2). Die Entstehung von Hv1-Varianten kann unterschiedliche Ursachen haben. Zum einen existieren viele Gene in verschiedenen Varianten. Zum anderen „reifen“ Proteine nach der Synthese: Eine solche Reifung kann darin bestehen, Proteine mit Hilfe von Enzymen (Proteasen) zurechtzuschneiden. Wie kann man einen solchen Schnitt nachweisen? Falls Spermien eine Hv1-schneidende Protease besitzen, sollte diese Protease auch ein vollständiges Hv1-Protein aus anderen Zellen schneiden können. Dazu haben wir uns ein Experiment ausgedacht (Abbildung 3, links): Wir vermischen eine Zellkultur, die vollständiges Hv1-Protein herstellt, mit Spermien. (Die Zellkultur produziert ein minimal verändertes Hv1-Protein, so dass es sich biochemisch von Hv1 aus Spermien unterscheiden lässt.) In diesem Mix entsteht tatsächlich die gekürzte Hv1-Variante (Abbildung 3, rechts)! Spermien besitzen also eine Protease, die Hv1 schneidet. Weil die neue, geschnittene Variante spezifisch für Spermien ist, nennen wir sie Hv1Sper.

An welcher Stelle schneiden menschliche Spermien den Hv1-Kanal? Durch weitere Experimente mit

as long as the pH does not vary between the inside and outside (pH_i und pH_o), the activation curves for pH 6, 7, and 8 are similar. We made an interesting discovery at this point: the short Hv1Sper variant behaves differently! The higher the pH, the further the activation curve is shifted to the left to more negative membrane potentials. Conversely, a low pH value shifts the activation curve to the right to more positive membrane potentials. If one considers that sperm have a negative membrane potential at rest, it becomes clear that Hv1Sper is mainly activated in the alkaline environment (i.e. at high pH values). Such an alkaline environment exists in the fallopian tube but not in the vaginal tract. Thus, cutting Hv1 could be an adaptation intended to trigger a proton flux of sperm in the fallopian tube but not in the vaginal tract. Future studies will have to be carried out to demonstrate whether this is in fact the case.

verschieden langen Hv1-Varianten konnten wir die Schnittstelle identifizieren: Die ersten 68 Aminosäuren des Kanals werden abgetrennt (Abbildung 4). Viel spannender aber ist die Frage: Weshalb benötigen Spermien eine kurze Hv1-Variante? Um die Auswirkungen des Schnitts auf die Funktion des Kanals zu untersuchen, haben wir Hv1Sper und Hv1 getrennt voneinander in Frosch-Eizellen herstellen lassen und untersucht. Mit Hilfe einer elektrophysiologischen Methode – der sogenannten Patch-Clamp-Technik – lassen sich die winzigen Ströme, die durch Ionenkanäle fließen, messen. Hv1 öffnet seine Pore und ein Protonenstrom fließt, wenn die Membranspannung positiv ist, d.h. wenn die Innenseite der Membran positiv geladen ist. Die Spannungsabhängigkeit lässt sich in Aktivierungskurven anschaulich darstellen (Abbildung 5). Die Spannungsabhängigkeit ist relativ unabhängig vom pH; solange der pH sich zwischen innen und außen (pH_i und pH_o) nicht unterscheidet, sehen die Aktivierungskurven bei pH 6, 7 und 8 ähnlich aus. Nun machten wir aber eine interessante Entdeckung: die kurze Hv1Sper-Variante verhält sich anders! Hier gilt: Je höher der pH, desto weiter ist die Aktivierungskurve nach links hin zu negativeren Membranspannungen verschoben. Umgekehrt verschiebt ein niedriger pH-Wert die Aktivierungskurve weiter nach rechts hin zu positiveren Membranspannungen. Bedenkt man, dass Spermien eine negative Spannung in Ruhe haben, wird klar, dass Hv1Sper vornehmlich im alkalischen Milieu (also bei hohen pH-Werten) aktiviert wird. Eine solche alkalische Umgebung existiert im Eileiter, aber nicht im Vaginaltrakt. Das Schneiden von Hv1 könnte also eine Anpassung sein, um einen Protonenstrom im Eileiter, jedoch nicht im Vaginaltrakt, auszulösen. Ob dies wirklich der Fall ist, müssen zukünftige Studien zeigen.

Contact | Kontakt

Prof. Dr. U. Benjamin Kaupp
Scientific Director
Department Molecular Sensory Systems
Phone +49 (0)228 9656-100
u.b.kaupp@caesar.de

References | Literaturhinweise

- [1] Strünker T, Goodwin N, Brenker C, Kashikar ND, Weyand I, Seifert R, Kaupp UB. The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca^{2+} influx in human sperm. *Nature* 2011, 471:382-6.
- [2] Lishko PV, Botchkina IL, Fedorenko A, Kirichok Y. Acid extrusion from human spermatozoa is mediated by flagellar voltage-gated proton channel. *Cell* 2010, 140:327-37.
- [3] Berger TK, Fußhöller DM, Goodwin N, Bönigk W, Müller A, Dokani Khesroshahi N, Brenker C, Wachten D, Krause E, Kaupp UB, Strünker T. Post-translational cleavage of Hv1 in human sperm tunes pH- and voltage-dependent gating. *J Physiol* 2017, 595:1533-46.





Gaucher disease

– an enigma like the Egyptian Sphinx

Dagmar Wachten | Minerva Max Planck Research Group Molecular Physiology

Gaucher disease is a genetic disorder of lipid metabolism. It is caused by different mutations in the gene encoding for lysosomal beta-glucosidase 1 (GBA1) [1]. GBA1 breaks the lipid glucosylceramide (GlcCer) down to glucose and ceramide in the lysosomes of cells (Figure 1a). So far so good. But, what might sound unimportant compared to e.g. the complex neurological activities related to perception and thinking, is actually essential for survival. Mutations in the human *GBA1* gene result in a loss of function of the enzyme and, thereby, a

Morbus Gaucher

– ein Rätsel wie die ägyptische Sphinx

Bei Morbus Gaucher handelt es sich um eine genetische Störung des Lipidstoffwechsels. Ursache hierfür sind verschiedene Mutationen in der genetischen Sequenz der lysosomalen beta-Glucosidase 1 (GBA1) [1]. GBA1 spaltet das Lipid Glucosylceramid (GlcCer) in den Lysosomen der Zellen zu Glucose und Ceramid (Abbildung 1a). So weit so gut. Doch was vielleicht im Vergleich zu beispielsweise den komplexen neurologischen Aktivitäten im Zusammenhang mit Wahrnehmung und Denken unwichtig klingen mag, ist de facto

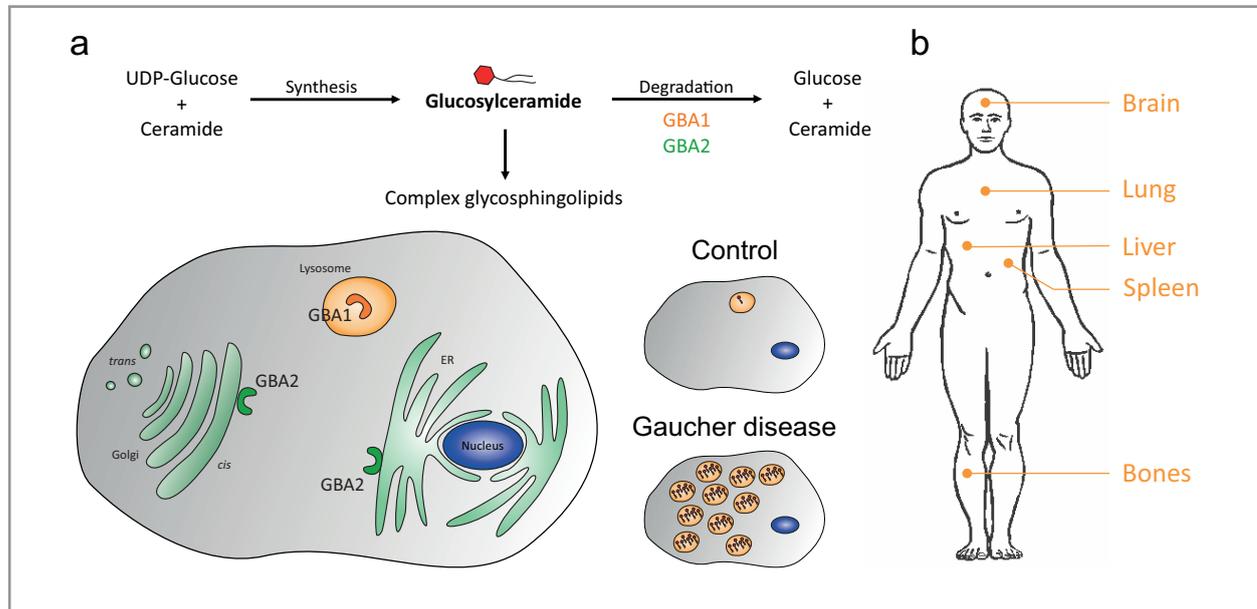


Figure 1. a. GBA1 and GBA2 break glucosylceramide (GlcCer) down to glucose and ceramide. Loss of GBA1 leads to the massive accumulation of GlcCer in “Gaucher cells”; the hallmark of Gaucher disease. b. Gaucher disease mainly affects organs like liver and spleen, but may also involve brain damage.

Abbildung 1. a. GBA1 und GBA2 spalten Glucosylceramid (GlcCer) zu Glucose und Ceramid. Ein Verlust der GBA1 führt zur massiven Ansammlung von GlcCer in „Gaucher-Zellen“, dem Markenzeichen von Morbus Gaucher. b. Morbus Gaucher beeinträchtigt vor allem Organe wie Leber und Milz, kann aber auch zu Gehirnschäden führen.

massive accumulation of its substrate, GlcCer, in the lysosomes. This effect is predominantly evident in tissue macrophages, our body's own cleaning personnel, which turn into severely enlarged “Gaucher cells”; causing an up to 25-fold increase in organ size of the patient's liver and spleen (Figure 1b). Furthermore, GlcCer may also be enriched in neurons, causing severe neurological defects and premature death in early childhood [2]. Due to its heterogeneous symptoms and phenotypes, Gaucher disease has been classified into three major subtypes, namely type I, II, and III. Type I Gaucher is the most common form of the disease, with patients showing symptoms like the aforementioned organomegaly or defects in lung and bone marrow [3]. Type II patients are characterized by severe neurological defects and usually die within the first 2-3 years of life [4]. Type III, the sub-acute form of the disease, involves symptoms of both, type I and II Gaucher disease, and, thus, represent an intermediate type [5]. The molecular pathways underlying these completely different

überlebenswichtig. Mutationen im menschlichen GBA1-Gen haben einen Funktionsverlust des Enzyms zur Folge und führen so zu einer massiven Ansammlung seines Substrats, GlcCer, in den Lysosomen. Diese Auswirkung zeigt sich vor allem in Gewebemakrophagen, der körpereigenen Putzkolonne, die sich wiederum in stark vergrößerte „Gaucher-Zellen“ umwandeln und dazu führen, dass sich Leber und Milz des Patienten um das bis zu 25-Fache vergrößern (Abbildung 1b). Zudem kann sich GlcCer auch in Neuronen anreichern und schwere neurologische Schäden verursachen bzw. einen vorzeitigen Tod im frühen Kindesalter zur Folge haben [2]. Aufgrund seiner heterogenen Symptome und Phänotypen wurde Morbus Gaucher in drei wichtige Unterklassen unterteilt: Typ I, II und III. Morbus Gaucher Typ I ist die häufigste Form der Erkrankung; die Patienten weisen Symptome wie die zuvor genannte Organomegalie oder Defekte in Lunge oder Knochenmark auf [3]. Typ II-Patienten zeichnen sich durch schwere neurologische

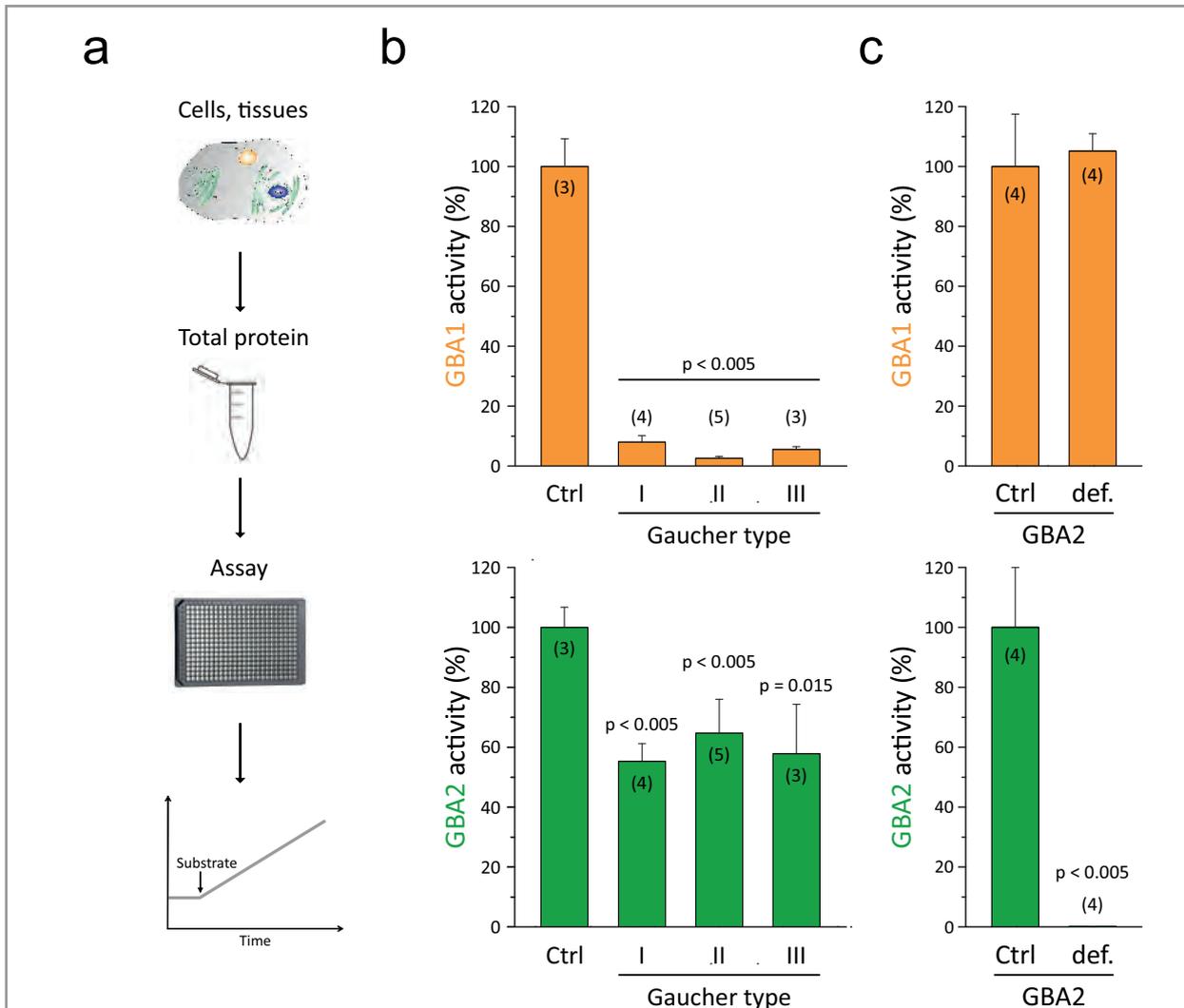


Figure 2. a. A fluorescence-based *in vitro* assay allows to measure the activities of both, GBA1 and GBA2 at the same time. b. Due to a genetic defect, GBA1 is barely active in fibroblasts from Gaucher patients. Surprisingly, GBA2 also shows reduced activity in cells from Gaucher patients. c. The GBA1 activity in CRISPR/Cas9-generated GBA2-deficient cells remains unchanged. Ctrl: Control, def.: deficient.

Abbildung 2. a. Ein Fluoreszenz-basiertes *in vitro*-Assay erlaubt die gleichzeitige Messung der Aktivitäten von GBA1 und GBA2. b. Aufgrund eines genetischen Defekts ist GBA1 in Fibroblasten von Gaucher-Patienten kaum aktiv. Überraschenderweise weist GBA2 ebenfalls eine reduzierte Aktivität in Zellen von Gaucher-Patienten auf. c. Die GBA1-Aktivität in CRISPR/Cas9-generierten GBA2-defizienten Zellen bleibt unverändert. Ctrl: Kontrolle, def.: defizient.

manifestations of Gaucher disease, however, are poorly understood and, for now, remain enigmatic.

To understand the cellular processes occurring due to the accumulation of GlcCer in Gaucher disease, we set out to investigate the role of GBA2, the second beta-glucosidase. GBA2 also cleaves

Defekte aus und sterben für gewöhnlich innerhalb der ersten zwei bis drei Lebensjahre [4] [5]. Typ III, die subakute Form der Erkrankung, geht mit Symptomen einher, die bei Morbus Gaucher Typ I und Typ II auftreten, und stellt somit einen Zwischentyp dar [6]. Die molekularen Signalwege, die diesen völlig unterschiedlichen Ausprägungen

GlcCer to glucose and ceramide, but, unlike GBA1, is located at the cytosolic side of the Golgi and ER (Figure 1a) [7]. Therefore, GBA2 represents a second cellular pathway besides GBA1 to break down GlcCer. Its function and role in GlcCer metabolism, however, are poorly understood. To analyze whether GBA2 is involved in Gaucher disease, we used our fluorescence-based *in vitro* assay that allows to measure the enzymatic activity of GBA1 and GBA2 at the same time (Figure 2a) [7]. We used dermal fibroblasts from patients suffering from Gaucher disease to study the activities of both enzymes and, as expected, saw that GBA1 was barely active in these cells. But, to our surprise, the GBA2 activity was also reduced in the patient samples compared to the healthy controls (Figure 2b). We repeated our experiments using embryonic fibroblasts from GBA1-deficient mice and CRISPR/Cas9-generated GBA1-deficient cells and always observed the same phenomenon: In the absence of GBA1, GBA2 activity was reduced. As a control, we determined the GBA1 activity in GBA2-deficient cells generated via CRISPR/Cas9; however, in the absence of GBA2 activity, the GBA1 activity remained largely unchanged (Figure 2c). From these surprising results we concluded that the GBA2 activity is down-regulated in cells in the absence of GBA1 activity, but not vice versa.

The chase begins

To gain mechanistic insight how GBA1 controls the activity of GBA2, we analyzed whether blocking GBA1 activity would be sufficient to reduce the activity of GBA2. We incubated control human fibroblasts with the GBA1-specific blocker CBE, which dramatically reduced the GBA1 activity. As consequence, the GBA2 activity was diminished down to ~39%. This effect was not only detectable in cell culture, but also in mice *in vivo*: Injection of control mice with different amounts of CBE resulted in a maximal block of GBA1 activity and, again, in a significant reduction in GBA2 activity. These results confirmed that blocking GBA1 activity is sufficient to reduce GBA2 activity. Since neither GBA2 mRNA nor protein expression were changed in GBA1-deficient cells, we concluded that the reduction in

von Morbus Gaucher zugrunde liegen, versteht man jedoch bislang kaum und sie bleiben vorerst rätselhaft.

Um die zellulären Prozesse zu verstehen, die aufgrund der Ansammlung von GlcCer bei Morbus Gaucher auftreten, begannen wir die Rolle von GBA2, der zweiten beta-Glucosidase, zu untersuchen. GBA2 spaltet ebenfalls GlcCer zu Glucose und Ceramid, befindet sich aber im Gegensatz zu GBA1 auf der zytosolischen Seite des Golgi-Apparates und des ER (Abbildung 1a) [7]. Damit stellt die GBA2 also einen zweiten zellulären Signalweg neben GBA1 für die Spaltung von GlcCer dar. Ihre Funktion und Rolle im GlcCer-Metabolismus versteht man bislang jedoch kaum. Um herauszufinden, ob GBA2 an Morbus Gaucher beteiligt ist, setzten wir unser Fluoreszenz-basiertes *in vitro*-Assay ein, das die gleichzeitige Messung der enzymatischen Aktivität von GBA1 und GBA2 ermöglicht (Abbildung 2a) [7]. Für die Untersuchung der Aktivitäten beider Enzyme nutzten wir dermale Fibroblasten von Patienten mit Morbus Gaucher und stellten wie erwartet fest, dass GBA1 in diesen Zellen kaum aktiv war. Zu unserer Überraschung war die GBA2-Aktivität bei den Patientenproben im Vergleich zu den gesunden Kontrollen jedoch ebenfalls reduziert (Abbildung 2b). Wir wiederholten unsere Experimente mit embryonalen Fibroblasten aus GBA1-defizienten Mäusen und CRISPR/Cas9-generierten GBA1-defizienten Zellen und beobachteten stets dasselbe Phänomen: In Abwesenheit von GBA1 war die GBA2-Aktivität reduziert. Als Kontrolle bestimmten wir die GBA1-Aktivität GBA2-defizienter, mittels CRISPR/Cas9 generierter Zellen; in Abwesenheit der GBA2-Aktivität blieb die GBA1-Aktivität jedoch im Wesentlichen unverändert (Abbildung 2c). Aus diesen überraschenden Ergebnissen schlossen wir, dass die GBA2-Aktivität in Abwesenheit der GBA1-Aktivität in Zellen herunterreguliert wird, dies aber umgekehrt nicht der Fall ist.

Um einen Einblick in den Mechanismus der Steuerung der GBA2-Aktivität durch GBA1 zu gewinnen, untersuchten wir, ob eine Blockade der GBA1-Aktivität genügt, um die GBA2-

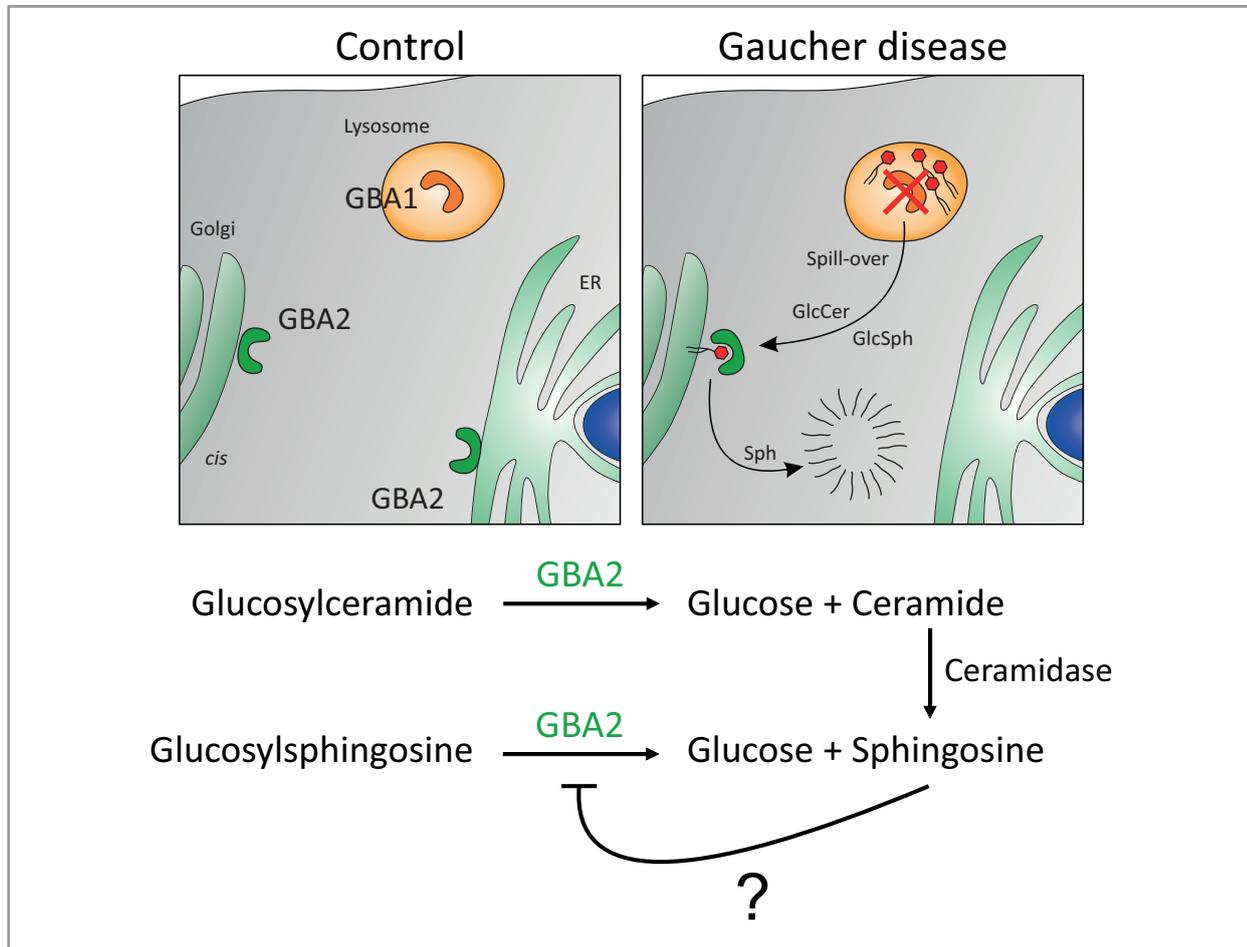


Figure 3. In Gaucher cells, accumulating GlcCer and GlcSph spill over into the cytoplasm and become a substrate for GBA2. In both cases, cytotoxic sphingosine is released. To avoid this scenario, cells might have developed a mechanism to inhibit GBA2.

Abbildung 3. In Gaucher-Zellen gelangen sich anreicherndes GlcCer und GlcSph in das Zytoplasma und werden zu einem Substrat für die GBA2. In beiden Fällen wird zytotoxisches Sphingosin freigesetzt. Um dieses Szenario zu vermeiden, könnten Zellen einen Mechanismus zur GBA2-Inhibition entwickelt haben.

GBA2 activity was likely due to the GBA1-dependent accumulation of GlcCer in the lysosomes of Gaucher cells.

Behind the scenes: Who is the manipulator?

However, loss of active GBA1 in Gaucher disease does not only result in accumulation of GlcCer in the lysosome, but also of the sphingolipid glucosylsphingosine (GlcSph). It has been proposed that during Gaucher disease, GlcCer and GlcSph spill-over into the cytoplasm, thereby becoming substrates for GBA2. GBA2 degrades GlcCer and

Aktivität zu reduzieren. Hierfür inkubierten wir als Kontrolle menschliche Fibroblasten mit dem GBA1-spezifischen Blocker CBE, der die GBA1-Aktivität drastisch reduzierte. Als Folge sank die GBA2-Aktivität auf etwa 39 %. Diese Auswirkung war nicht nur in der Zellkultur, sondern auch bei Mäusen *in vivo* nachweisbar: Kontrollmäuse, denen unterschiedliche Mengen CBE injiziert worden waren, wiesen eine maximale Blockade der GBA1-Aktivität und erneut eine signifikante Reduktion der GBA2-Aktivität auf. Diese Ergebnisse bestätigten, dass eine Blockade der GBA1-Aktivität genügt, um

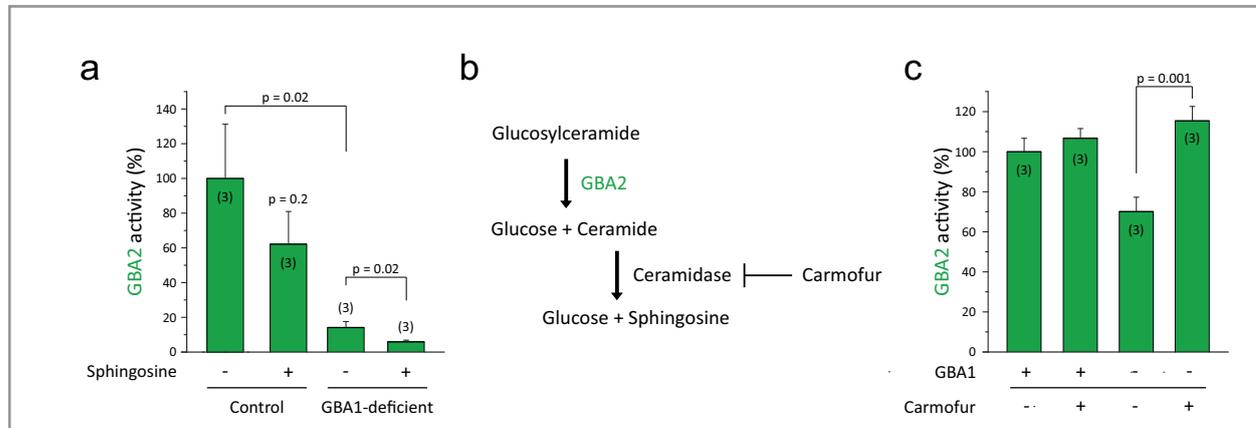


Figure 4. a. Sphingosine reduces the GBA2 activity in control cells and GBA1-deficient cells. b. Carmofur prevents the release of cytotoxic sphingosine by blocking ceramidase. Reduction of sphingosine by Carmofur reverses the inhibition of GBA2 in GBA1-deficient cells.

Abbildung 4. a. Sphingosin reduziert die GBA2-Aktivität in Kontrollzellen und GBA1-defizienten Zellen. b. Carmofur verhindert die Freisetzung von zytotoxischem Sphingosin durch Blockade der Ceramidase. Die Reduktion von Sphingosin durch Carmofur hebt die Inhibition von GBA2 in GBA1-defizienten Zellen auf.

GlcSph to glucose and ceramide or sphingosine, respectively (Figure 3). We determined the level of sphingosine in control and GBA1-deficient fibroblasts and found the sphingosine level to be elevated in cells from Gaucher disease patients. However, sphingosine is very cytotoxic. Thus, we hypothesized that cells accumulating GlcCer and GlcSph, due to a loss of GBA1 activity, might have developed a mechanism, whereby GBA2 activity is diminished to avoid a cytotoxic accumulation of sphingosine. Therefore, the simplest scenario that came to our minds was a direct regulation of GBA2 activity by the cytotoxic metabolite sphingosine.

To test this hypothesis, we first analyzed whether the GBA2 activity is sensitive to sphingosine. Incubation of cells stably over-expressing GBA2 with low micromolar amounts of sphingosine significantly reduced the activities of both, GBA1 and GBA2. However, this experimental set up does not allow to conclude whether both, GBA1 and GBA2 are sensitive to sphingosine, since a sphingosine-dependent reduction of GBA1 activity would be sufficient to reduce GBA2 activity. To study the effect of sphingosine on GBA2 in a GBA1-independent manner, we

die GBA2-Aktivität zu reduzieren. Da weder die GBA2-mRNA- noch die Proteinexpression in GBA1-defizienten Zellen verändert waren, schlossen wir, dass die Reduktion der GBA2-Aktivität wahrscheinlich Folge der GBA1-abhängigen Ansammlung von GlcCer in den Lysosomen von Gaucher-Zellen ist.

Hinter den Kulissen: Wer ist verantwortlich?

Der Verlust der GBA1 bei Morbus Gaucher führt nicht nur zu einer Ansammlung von GlcCer, sondern auch von Glucosylsphingosin (GlcSph) im Lysosom. Man nimmt an, dass GlcCer und GlcSph bei Morbus Gaucher in das Zytoplasma gelangen und hier zu Substraten für die GBA2 werden. GBA2 spaltet GlcCer und GlcSph zu Glucose und Ceramid bzw. Sphingosin auf (Abbildung 3). Wir bestimmten die Sphingosinkonzentration in Kontroll- und GBA1-defizienten Fibroblasten und stellten fest, dass die Sphingosinkonzentration in Zellen von Morbus Gaucher-Patienten erhöht war. Sphingosin ist jedoch extrem zytotoxisch. Wir stellten daher die Hypothese auf, dass Zellen, in denen sich GlcCer und GlcSph aufgrund eines Verlustes der GBA1-Aktivität ansammeln, einen Mechanismus entwickelt haben könnten, mit dessen Hilfe die GBA2-Aktivität

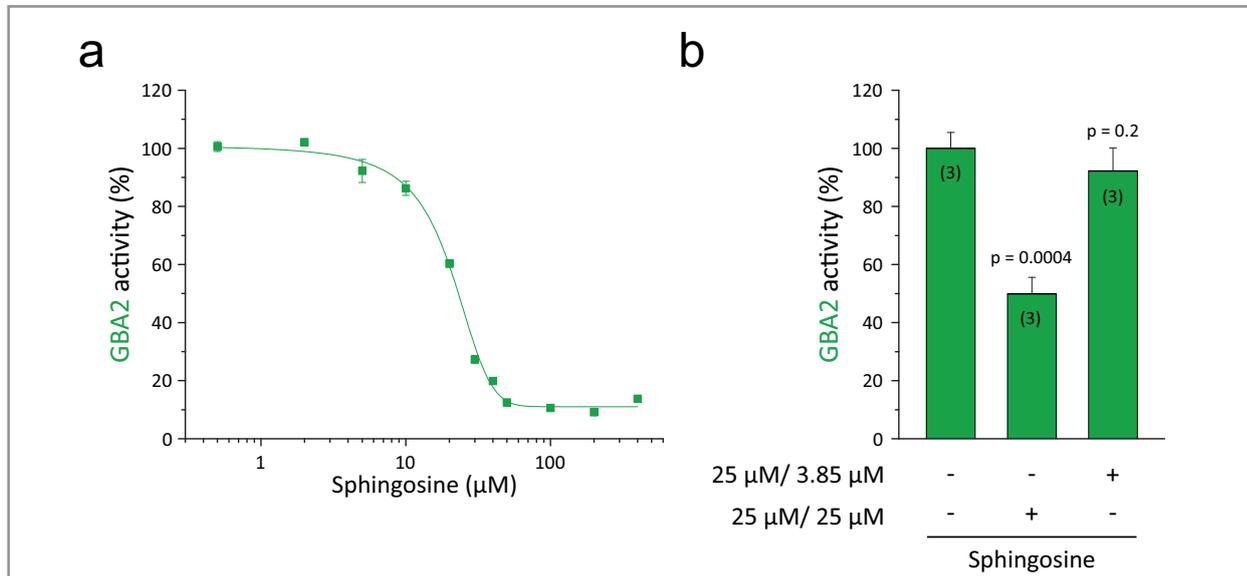


Figure 5. a. Sphingosine inhibits GBA2 in bacterial lysates with an IC_{50} of $25.0 \pm 0.2 \mu\text{M}$. b. Diluting the sphingosine concentration after pre-incubation fully recovers the activity of GBA2.

Abbildung 5. a. Sphingosin inhibiert GBA2 in Bakterienlysaten mit einer IC_{50} von $25,0 \pm 0,2 \mu\text{M}$. b. Durch Verdünnung der Sphingosinkonzentration nach Vorinkubation wird die GBA2-Aktivität vollständig wiederhergestellt.

repeated the same experiment with embryonal fibroblasts from GBA1-deficient mice, where sphingosine treatment indeed further reduced the GBA2 activity compared to the non-treated samples (Figure 4a). Thus, we concluded that the activity of GBA2 is sensitive to sphingosine. As a control and to determine whether decreasing the levels of sphingosine reverses the inhibition of GBA2 activity, we incubated control and GBA1-deficient cells with the ceramidase inhibitor Carmofur (Figure 4b). In the presence of Carmofur, ceramide levels were increased, whereas levels of sphingobases like sphingosine were reduced. In control cells, Carmofur had no effect on GBA2 activity, whereas in GBA1-deficient cells, where GBA2 activity is reduced, the inhibition was reversed in the presence of Carmofur (Fig 4c). Heureka!

To further investigate whether sphingosine exerts a direct effect on GBA2 or whether other cellular components indirectly mediate the inhibition of sphingosine on GBA2 activity, we expressed mGBA2 in bacteria. We assayed the dose-response

verringert wird, um eine zytotoxische Ansammlung von Sphingosin zu vermeiden. Das einfachste Szenario, das uns in den Sinn kam, war daher eine direkte Regulierung der GBA2-Aktivität durch den zytotoxischen Metaboliten Sphingosin.

Zur Überprüfung dieser Hypothese untersuchten wir zunächst, ob die GBA2-Aktivität durch Sphingosin beeinflussbar ist. Die Inkubation von Zellen, die eine stabile GBA2-Überexpression aufwiesen, mit geringen mikromolaren Mengen Sphingosin reduzierte die Aktivität von GBA1 und GBA2 signifikant. Dieser Versuchsaufbau erlaubt jedoch keine Rückschlüsse darauf, ob sowohl GBA1 als auch GBA2 durch Sphingosin inhibiert werden, da eine Sphingosin-abhängige Reduktion der GBA1-Aktivität genügen würde, um die GBA2-Aktivität zu reduzieren. Um die Auswirkung von Sphingosin auf die GBA2 GBA1-unabhängig zu untersuchen, wiederholten wir das Experiment mit embryonalen Fibroblasten von GBA1-defizienten Mäusen, bei denen die Sphingosin-Behandlung in der Tat zu einer weiteren Reduktion der GBA2-Aktivität im Vergleich zu den nicht-behandelten

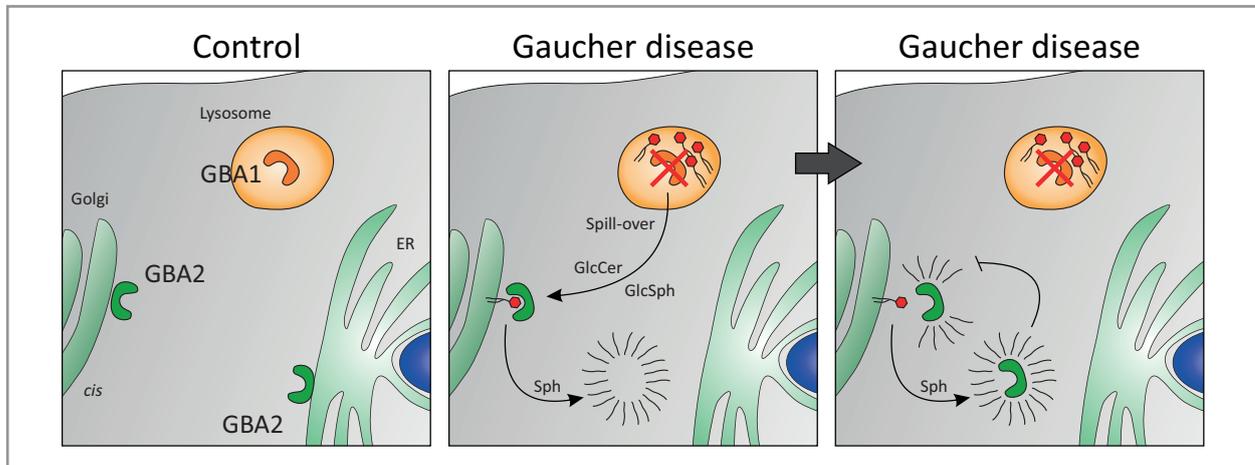


Figure 6. In Gaucher disease, accumulating GlcCer and GlcSph might be cleaved by GBA2 in the cytoplasm, by which cytotoxic sphingosine is released. To avoid toxication, cells have developed a mechanism by which sphingosine directly inhibits GBA2.

Abbildung 6. Bei Morbus Gaucher können sich anreicherndes GlcCer und GlcSph durch GBA2 im Zytoplasma aufgespalten werden, wodurch zytotoxisches Sphingosin freigesetzt wird. Um eine Vergiftung zu vermeiden, haben die Zellen einen Mechanismus entwickelt, nach dem Sphingosin die GBA2 direkt inhibiert.

relationship of GBA2 for sphingosine in bacterial lysates, where sphingosine reduced the GBA2 activity with an IC_{50} of $25.0 \pm 0.2 \mu M$ (Figure 5a). These results indicate that sphingosine directly inhibits GBA2. We also studied whether other sphingolipid metabolites are able to inhibit GBA2 activity. Sphingosine-1-phosphate (S1P) structurally differs from sphingosine, as it bears a negatively charged phosphate head group. S1P did not inhibit GBA2 activity, suggesting that the presence of a phosphate group disturbs the sphingosine-dependent inhibition of GBA2 activity. However, sphingobases like sphinganine, which is the saturated form of sphingosine, and FTY720, which carries an octylphenyl group in its carbon tail, also exhibit an inhibitory effect. Finally, we tested whether the sphingosine-dependent block of GBA2 activity is reversible. We revealed that diluting the sphingosine concentration after pre-incubation fully recovers the activity of GBA2 (Figure 5b). These results indicate that sphingosine reversibly blocks GBA2 activity.

And the answer is... sphingosine!

In this study, we could provide new insights into

Proben führte (Abbildung 4a). Daraus schlossen wir, dass die Aktivität von GBA2 durch Sphingosin verringert wird. Als Kontrolle und zur Bestimmung, ob eine Abnahme der Sphingosin-Konzentration zu einer Aufhebung der Inhibition der GBA2-Aktivität führt, inkubierten wir Kontroll- und GBA1-defiziente Zellen mit dem Ceramidase-Inhibitor Carmofur (Abbildung 4b). In Gegenwart von Carmofur stieg die Ceramidkonzentration an, wohingegen die Spiegel der Sphingobasen wie Sphingosin sanken. In den Kontrollzellen hatte Carmofur keine Auswirkung auf die GBA2-Aktivität, wohingegen die Inhibition der GBA2 in GBA1-defizienten Zellen in Gegenwart von Carmofur aufgehoben wurde (Abbildung 4c). Heureka!

Zur weiteren Klärung der Frage, ob Sphingosin direkte Auswirkungen auf GBA2 hat oder andere Zellbestandteile die Inhibition von Sphingosin bezüglich der GBA2-Aktivität indirekt vermitteln, haben wir rekombinantes mGBA2 in Bakterien exprimiert. Wir analysierten die Dosis-Wirkungs-Beziehung von GBA2 in Bezug auf Sphingosin in Bakterienlysaten, wobei Sphingosin die GBA2-Aktivität mit einer IC_{50} von $25,0 \pm 0,2 \mu M$ reduzierte

the regulation of GBA2 activity, in particular in Gaucher disease. We demonstrate that GBA2 activity depends on GBA1 activity, but not vice versa, and that this mechanism applies generally. In conclusion, we reveal a sphingosine-dependent regulation of GBA2 activity, which occurs in the absence of GBA1 activity and might also occur in Gaucher disease (Figure 6). Our results add a new chapter to the understanding of the molecular mechanism underlying Gaucher disease pathology, presenting new ideas for the therapy of this severe lysosomal storage disorder.

However, there are still a number of questions, which need to be addressed: Why do the same genetic defects and biochemical findings in Gaucher disease cause such different clinical pictures? What is the effect of GBA2 on the growth and function of nerve cells? Is there a link between the activity of GBA2 and the neurological disorders that may be associated with Gaucher disease? Is there a way to avoid the production of cytotoxic metabolites like sphingosine without causing other side effects? Thus, the mystery around the enigmatic sphingosine continues.

(Abbildung 5a). Diese Ergebnisse legen nahe, dass Sphingosin die GBA2 direkt inhibiert. Wir untersuchten zudem, ob andere Sphingolipid-Metabolite die GBA2-Aktivität inhibieren können. Sphingosin-1-phosphat (S1P) unterscheidet sich strukturell von Sphingosin, da es eine negativ geladene Phosphat-Kopfgruppe aufweist. S1P führte nicht zu einer Inhibition der GBA2-Aktivität, was darauf deutet, dass die Gegenwart einer Phosphatgruppe die Sphingosin-abhängige Inhibition der GBA2-Aktivität stört. Sphingobasen wie Sphinganin, die gesättigte Form des Sphingosins, und FTY720, das eine Octylphenyl-Gruppe an seiner Kohlenstoffkette aufweist, besitzen jedoch ebenfalls eine inhibitorische Wirkung. Schließlich untersuchten wir, ob die Sphingosin-abhängige Blockade der GBA2-Aktivität reversibel ist. Wir zeigten, dass eine Verdünnung der Sphingosinkonzentration nach Vorinkubation zu einer vollständigen Wiederherstellung der GBA2-Aktivität führt (Abbildung 5b). Diese Ergebnisse legen nahe, dass Sphingosin die GBA2 reversibel blockiert.

Und die Antwort lautet... Sphingosin!

In dieser Studie konnten wir neue Einblicke in die Regulierung der GBA2-Aktivität, vor allem bei Morbus Gaucher, vermitteln. Wir belegen, dass die GBA2-Aktivität von der GBA1-Aktivität abhängt, dies jedoch umgekehrt nicht der Fall ist, und dass dieser Mechanismus allgemeingültig ist. Zusammenfassend offenbaren wir eine Sphingosin-abhängige Regulierung der GBA2-Aktivität, die in Abwesenheit der GBA1 erfolgt und auch bei Morbus Gaucher auftreten kann (Abbildung 6). Unsere Ergebnisse fügen dem Verständnis des molekularen Mechanismus, welcher der Pathologie von Morbus Gaucher zugrunde liegt, ein neues Kapitel hinzu und präsentieren neue Ideen für die Therapie dieser schweren lysosomalen Speichererkrankung.

Dennoch ist noch immer eine Reihe von Fragen ungeklärt: Warum resultieren dieselben genetischen Defekte und biochemischen Befunde bei Morbus Gaucher in so unterschiedlichen Krankheitsbildern? Welche Auswirkung hat GBA2 auf das Wachstum

und die Funktion von Nervenzellen? Gibt es einen Zusammenhang zwischen der Aktivität von GBA2 und den mit Morbus Gaucher assoziierten neurologischen Erkrankungen? Besteht eine Möglichkeit, die Entstehung zytotoxischer Metabolite wie Sphingosin zu vermeiden, ohne andere Nebenwirkungen hervorzurufen? Das rätselhafte Sphingosin bleibt also geheimnisvoll.

Contact | Kontakt

Prof. Dr. Dagmar Wachten
Group Leader
Minerva Research Group
Molecular Physiology
Phone +49 (0)228 9656-311
dagmar.wachten@caesar.de

References | Literaturhinweise

- [1] Brady, R. O., Barton, N. W. & Grabowski, G. A. (1993) "The role of neurogenetics in Gaucher disease" *Archives of neurology* 50, 1212-1224
- [2] Cox, T. M. (2001) "Gaucher disease: understanding the molecular pathogenesis of sphingolipidoses" *Journal of inherited metabolic disease* 24 Suppl 2, 106-121; discussion 187-108
- [3] Zimran, A., Gelbart, T., Westwood, B., Grabowski, G. A. & Beutler, E. (1991) "High frequency of the Gaucher disease mutation at nucleotide 1226 among Ashkenazi Jews" *American journal of human genetics* 49, 855-859
- [4] Brady, R. O., Kanfer, J. N. & Shapiro, D. (1965) "Metabolism of Glucocerebrosides. II. Evidence of an Enzymatic Deficiency in Gaucher's Disease" *Biochemical and biophysical research communications* 18, 221-225
- [5] Scriver, C. R. (1995) "The metabolic and molecular bases of inherited disease".
- [6] Erikson, A., Bembi, B. & Schiffmann, R. (1997) "Neuronopathic forms of Gaucher's disease" *Bailliere Clin Haem* 10, 711-723
- [7] Körschen, H. G., Yildiz, Y., Raju, D. N., Schonauer, S., Bonigk, W., Jansen, V., Kremmer, E., Kaupp, U. B. & Wachten, D. (2013) "The non-lysosomal beta-glucosidase GBA2 is a non-integral membrane-associated protein at the endoplasmic reticulum (ER) and Golgi" *The Journal of biological chemistry* 288, 3381-3393



Tactile perception in the computer brain

Marcel Oberlaender | Max Planck Research Group: In Silico Brain Sciences

How are decisions formed in the brain? Investigations on the rat nervous system show that the basic principles of such complex processes can be studied on detailed models of neuronal networks. Novel techniques allow reconstructing the structure of neurons after having studied their function in living animals. By means of these data, models of entire brain areas can be created. By simulating neuronal activity patterns in these anatomically detailed network models, we hope to gain insight into how sensory information and behaviors that arise from it are encoded in the brain.

Der Tastsinn im Computergehirn

Wie entstehen Entscheidungen in unserem Gehirn? Untersuchungen am Nervensystem der Ratte zeigen, dass sich die Grundlagen solch komplexer Prozesse an detailgetreuen Modellen neuronaler Netzwerke studieren lassen. Neue Methoden erlauben es, die Struktur von Nervenzellen zu rekonstruieren, nachdem zuvor deren Funktion am lebenden Tier untersucht wurde. Aus diesen Daten können Modelle ganzer Hirnareale erstellt werden. Mithilfe von Computersimulationen neuronaler Aktivität in diesen Netzwerkmodellen erhoffen wir uns

Our brain is continuously processing information. This includes sensory information about our environment: visual stimuli via our eyes, smells via our nose, noises via our ears, and tactile signals via mechanical “tactile sensors” beneath our skin. Furthermore, our brain processes motor information about ourselves: in which direction are we moving, or what is the position of our sensory organs in relation to this direction? The integration of this sensory and motor information in the brain is considered to be the basis for the planning and execution of our behavior, for example when taking decisions. Can I wade through a stream? Or would it be better to jump across it? Or would it be better to carry on walking until reaching a bridge?

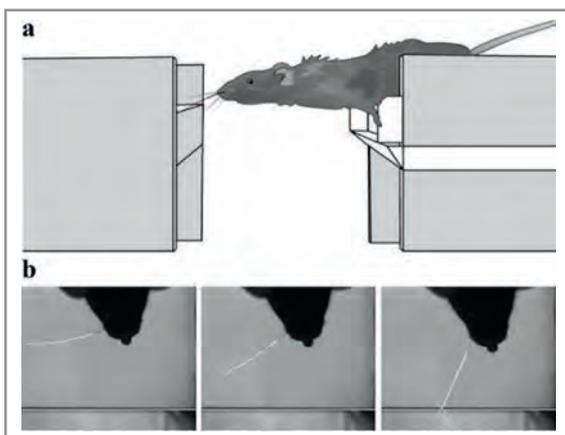


Figure 1. a. Rats can feel the width of a gap in complete darkness with the aid of facial whiskers. Only the contact by a single whisker is sufficient for the decision to jump across the gap. b. For this purpose, the animals actively move their whiskers backwards and forwards. The resulting sensory information, combined with the motor information about the location of the whisker, is sufficient to determine the width of the gap.

Abbildung 1. a. Ratten können bei völliger Dunkelheit die Breite eines Grabens mithilfe von Tasthaaren erfühlen. Die Berührung mit nur einem Tasthaar reicht aus, um die Entscheidung zu treffen, den Graben zu überspringen. b. Die Tiere bewegen dazu aktiv ihre Tasthaare vor und zurück. Die sensorische Information der Berührung, kombiniert mit der motorischen Information, wo sich das Tasthaar zum Zeitpunkt der Berührung befindet, reicht aus, um die Breite des Grabens zu bestimmen.

Erkenntnisse darüber, wie Informationen im Gehirn verarbeitet werden.

Unser Gehirn verarbeitet ständig Informationen. Zum einen sensorische Informationen über unsere Umwelt: Wir nehmen visuelle Reize über unsere Augen wahr, Gerüche über die Nase, Geräusche über die Ohren, und taktile Signale über mechanische „Tastsensoren“ unter unserer Haut. Zum anderen motorische Informationen über uns selbst: In welche Richtung bewegen wir uns beziehungsweise wo befinden sich unsere jeweiligen Sinnesorgane in Bezug auf diese Richtung? Die Integration solcher sensorischer und motorischer Informationen im Gehirn gilt als Grundlage für die Planung und Umsetzung unseres Verhalten, wie zum Beispiel dem Treffen von Entscheidungen: Kann ich einen Bach durchwaten? Sollte ich ihn besser überspringen? Oder sollte ich doch lieber weitergehen und auf eine Brücke warten?

Wir sind weit davon entfernt zu verstehen, wie die Integration sensorischer und motorischer Informationen in unserem Gehirn im Detail abläuft. Noch weniger wissen wir, wie aus diesen Prozessen ein Verhalten entsteht oder gar Entscheidungen getroffen werden. Das grundlegende Problem bei der Erforschung all dieser Prozesse ist es, dass sich diese nur am lebenden, sich „verhaltenden“ Gehirn studieren lassen. Des Weiteren läuft die Informationsverarbeitung in vielen Hirnregionen parallel ab. Diese Hirnregionen sind zudem miteinander verbunden, und in jeder einzelnen Region sind gleichzeitig Tausende von Nervenzellen aktiv, die ihrerseits wiederum in komplexen Netzwerken miteinander verbunden sind. Idealerweise müsste man daher all diese Nervenzellen gleichzeitig beobachten und wissen, wie sie miteinander verschaltet sind – innerhalb der Hirnregionen und über sie hinweg. Dies ist angesichts der großen Ausdehnung der Netzwerke, der gleichzeitig sehr kleinen Dimensionen der Nervenzellstrukturen und der hohen Geschwindigkeit, mit der Informationen zwischen den Zellen ausgetauscht werden, bis heute nur sehr eingeschränkt möglich.

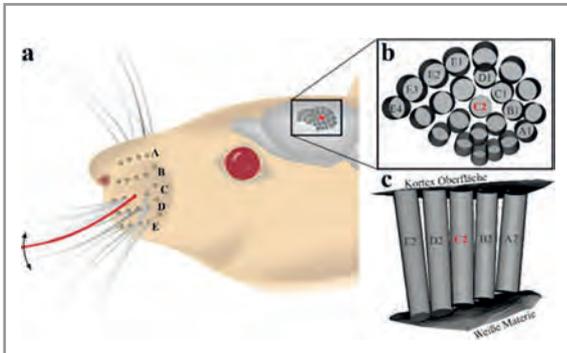


Figure 2. a. Whiskers are arranged in five rows (A-E) along the snout of the rat. In the somatosensory cortex of the rat, each whisker is represented by special networks, which are arranged in analogy with the organization of the whiskers (black frame). b. Three-dimensional reconstruction of the structures in the somatosensory cortex of the rat which are associated with the individual whiskers [6]. c. Cross-section through the cortex reconstruction in Figure 2. b.

Abbildung 2. a. Tasthaare sind entlang der Schnauze von Ratten in fünf Reihen (A-E) angeordnet. Jedes Tasthaar ist durch spezielle Netzwerke im somatosensorischen Kortex der Ratte repräsentiert, welche analog zur Organisation der Tasthaare angeordnet sind (schwarzer Rahmen). b. Dreidimensionale Rekonstruktion der mit einzelnen Tasthaaren assoziierten Strukturen im somatosensorischen Kortex der Ratte [6]. c. Querschnitt durch die Kortex-Rekonstruktion aus Abbildung 2. b.

We are far away from understanding how the integration of sensory and motor information in our brain works in detail. We know even less about how these processes give rise to a particular behavior or how decisions are made. The fundamental problem in the investigation of all these processes is that they can only be studied on a living, "behaving" brain. Furthermore, the information is processed simultaneously in many regions of the brain. These brain regions are connected with each other, and thousands of nerve cells, connected in complex networks, are simultaneously active in each individual region. Ideally, all these nerve cells must therefore be observed simultaneously

Ein Teil zur Lösung dieser Probleme liegt in der Reduzierung ihrer Komplexität. Es bietet sich deshalb an, die Integration sensorischer und motorischer Informationen – und das daraus entstehende Verhalten – an Modellsystemen zu untersuchen, die einfacher sind als das menschliche Gehirn. So können zum Beispiel Ratten die Entscheidung treffen, über einen etwa fünf Zentimeter breiten Graben zu springen (Abbildung 1), indem sie dessen andere Seite mit Tasthaaren erfühlen (Abbildung 2). Dabei bewegen die Tiere ihre Tasthaare aktiv vor und zurück. Erreicht keines der Tasthaare die andere Seite, verweigern die Ratten die Überquerung des Grabens. Daher ist die sensorische Information, die der Entscheidungsfindung – Springen oder Bleiben? – zugrunde liegt, auf den taktilen Reiz eines einzelnen Sinnesorgans reduziert, also der Berührung eines Tasthaars. Zugleich ist aber auch die interne motorische Information reduziert: Wo befindet sich das Tasthaar zum Zeitpunkt der Berührung? Die Integration dieser beiden Informationen im Gehirn sollte ausreichen, um die Breite des Grabens zu bestimmen und somit die entsprechende Verhaltensreaktion auszulösen.

Ein Teil der Lösung ist also, die Komplexität von Verhalten und zugrundeliegender sensorischer und motorischer Information auf ein Minimum zu reduzieren. Ein zweiter Teil liegt darin, nicht darauf angewiesen zu sein, die Verknüpfungs- und Aktivitätsmuster aller Nervenzellen gleichzeitig beobachten zu müssen. Wir haben daher Methoden entwickelt, mit denen man die komplette dreidimensionale Struktur einzelner Nervenzellen rekonstruieren kann, nachdem deren Aktivitätsmuster – zum Beispiel nach Berührung eines Tasthaars – gemessen wurden. Die Messung dieser Kombination von Struktur und Funktion vieler Nervenzellen lässt es dann zu, wiederkehrende Muster in unterschiedlichen Experimenten und Tieren zu erkennen. Dieser Ansatz erlaubte die Identifizierung der zehn wesentlichen Typen von Nervenzellen (Abbildung 3a) in dem mit Tasthaaren assoziierten Bereich der Großhirnrinde – dem sogenannten somatosensorischen Kortex. Nervenzellen eines Typs glichen sich nicht nur in

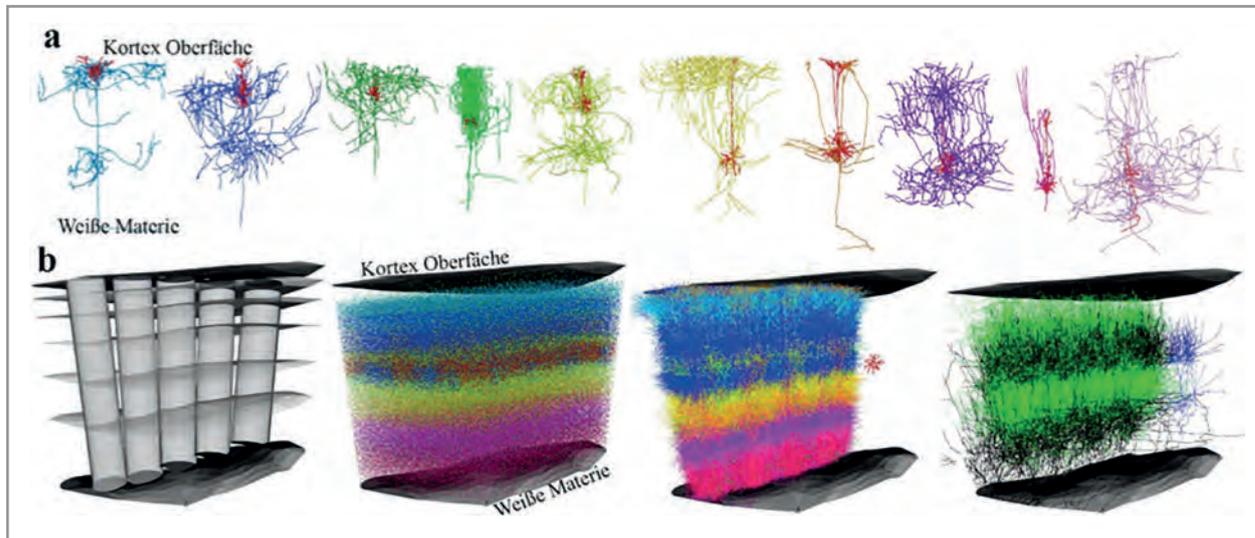


Figure 3. a. Three-dimensional reconstruction of the structure of individual nerve cells, whose activity was measured in a living animal. The structures in red represent the dendrites by which nerve cells receive signals from other nerve cells. The multi-coloured structures represent the axon of the particular cell, via which signals are transmitted to other nerve cells. Each reconstruction stands for one of the ten major nerve cell types in the somatosensory cortex of the rat [4]. b. Three-dimensional detailed model of the rat's somatosensory cortex [4]. From left to right: Model of the cortex geometry [6]; the distribution of all cell bodies, coloured according to type [5]; the distribution of all dendrites, coloured according to type [3]; the distribution of all axons of two exemplary types (green: inhibiting cells in layer 4, black: from cells in the thalamus.) [7].

Abbildung 3. a. Dreidimensionale Rekonstruktion der Struktur einzelner Nervenzellen, deren jeweilige Aktivität im lebenden Tier gemessen wurde. Die rot gefärbten Strukturen repräsentieren die Dendriten, entlang welcher Nervenzellen Signale von anderen Nervenzellen empfangen. Die bunt gefärbten Strukturen repräsentieren das Axon der jeweiligen Zelle, über welches Signale zu andern Nervenzellen weitergeleitet werden. Jede Rekonstruktion steht beispielhaft für einen der zehn wesentlichen Nervenzelltypen im somatosensorischen Kortex der Ratte [3]. b. Dreidimensionales detailliertes Modell des somatosensorischen Kortex der Ratte [4]. Von links nach rechts: Modell der Kortex-Geometrie [6]; der Verteilung aller Zellkörper, eingefärbt nach Typ [5]; der Verteilung aller Dendriten, eingefärbt nach Typ [3]; der Verteilung aller Axone zweier exemplarischer Typen (grün: hemmende Zellen in Schicht 4, schwarz: anregenden Zellen im Thalamus) [7].

and one needs to know how they are connected to each other – within the regions of the brain and beyond. This is still only possible to a limited extent, due to the large network area, the small dimensions of nerve cell structures, and the high-speed information exchange between the cells.

To solve these problems, it is essential to reduce complexity. Therefore, we focus on model systems that are simpler than the human brain. Rats, for example, can decide whether to jump across a gap around five centimeters in width (Figure 1) by

ihrer Position und Struktur, sondern auch darin, wie sie mit anderen Nervenzellen verknüpft sind und welche Aktivität sie nach sensorischer Reizung der Tastaare zeigen.

Mithilfe dieser Erkenntnisse über wichtige Prinzipien der Zusammenhänge zwischen Struktur, Funktion und Verknüpfungen von Nervenzellen ist es uns gelungen, diese Messdaten zu digitalisieren und daraus ein detailgetreues Computermodell des somatosensorischen Kortex der Ratte zu erstellen (Abbildung 3b). Es besteht aus etwa

sensing the other side with their facial whiskers (Figure 2). The animals do this by actively moving these tactile sensors backwards and forwards. If none of the whiskers reaches across to the other side, the rats refuse to cross the gap. The sensory information which forms the basis of the decision-making – to jump or not to jump? – is therefore reduced to the tactile stimulus of one single sensory organ, i.e. the contact of a whisker. At the same time, the internal motor information is also reduced to where the whisker is located during the contact. The integration of these two pieces of information in the brain should be sufficient to determine the width of the gap and thus trigger the behavior.

Part of the solution is therefore to reduce the complexity of behavior and the corresponding sensory and motor information to a minimum. Secondly, it would be useful to observe all nerve cells involved simultaneously. We have therefore developed methods whereby the complete three-dimensional structure of individual nerve cells can be reconstructed after their activity patterns have been measured. Measuring this combination of structure and function for a large number of nerve cells then enables us to recognize generalizable patterns in different experiments and animals. This approach has made it possible to identify ten essential types of nerve cells (Figure 3a) in the region of the cerebral cortex associated with facial whiskers – the so-called somatosensory cortex. Nerve cells of one type resembled each other not only in position and structure, but also in how they are connected with other nerve cells and how they react to the sensory stimulus.

With the aid of these findings on important principles of the relationships between structure, function and neural connections we have succeeded in digitising these measurement data and creating a computer model of the rat's somatosensory cortex (Figure 3b). The model consists of around 500,000 nerve cells which have approximately 5,000,000,000 synaptic contacts. This model reproduces not only the curved geometry of the cortex with its different

500.000 Nervenzellen, die wiederum durch etwa 5.000.000.000 sogenannte synaptische Kontakte miteinander verbunden sind. Dieses Modell reproduziert nicht nur die gekrümmte und unterschiedlich dicke Geometrie des Kortex sowie die Anzahl und Verteilung aller Nervenzellen in dieser Hirnregion, sondern auch vielfältigste Messungen bezüglich der Verschaltungsmuster zwischen den jeweiligen Nervenzelltypen.

Dieses anatomisch detaillierte Modell einer ganzen Region des Kortex eröffnet einzigartige Möglichkeiten, um die Zusammenhänge von Struktur und Funktion neuronaler Netzwerke zu erforschen. So können die Nervenzellen im Modell mit den zuvor gemessenen Aktivitätsmustern animiert werden. Der Traum, alle Nervenzellen gleichzeitig beobachten zu können und ihr Zusammenspiel in komplexen Netzwerken zu begreifen, rückt somit ein Stück näher. In ersten Studien konnten Aktivitätsmuster im Computermodell simuliert werden, wie sie zuvor nach Berührung einzelner Tasthaare gemessen wurden [1, 2]. Die Reproduktion dieser Aktivitätsmuster erlaubt es nun, mögliche Mechanismen zu erforschen, die der Informationsverarbeitung zugrunde liegen. So können im Modell bestimmte Mechanismen blockiert werden. Simulationen unter diesen geänderten Bedingungen ergeben Vorhersagen, wie sich Aktivitätsmuster im lebenden Tier verändern sollten, wenn dort dieselben Mechanismen blockiert werden. Die Überprüfung der Vorhersagen am lebenden Tier erlaubt dann Einblicke in Mechanismen der neuronalen Informationsverarbeitung, die mit konventionellen experimentellen Ansätzen nur schwer zu erreichen sind.

Ausblick

Die beschriebenen Methoden, Modelle und Ergebnisse sind weit davon entfernt, endgültige Antworten auf die oben aufgeworfenen Fragen zu geben. Nichtsdestotrotz eröffnet dieser Ansatz neue Möglichkeiten, das Zusammenspiel vieler Parameter zu studieren, welche gleichzeitig die Aktivität einer Nervenzelle bestimmen und beeinflussen – angefangen von zellulären Eigenschaften bis hin zu synaptischen Verschaltungsmustern. Dies ermöglicht

thicknesses, and the number and distribution of all nerve cells in this brain region, but also a large variety of measurements regarding the connection patterns between the particular types of nerve cells.

This anatomically detailed model of a whole region of the cortex enables us to study the structure-function relationship of neural networks in a novel way. The nerve cells in the model can be stimulated with the previously measured activity patterns, for example. The dream of observing all nerve cells simultaneously and to understand their interaction in complex networks is thus getting closer. In initial studies, it has been possible to simulate activity patterns in the computer model like those measured previously after tactile input [1, 2]. Reproducing these activity patterns now allows us to investigate possible mechanisms which form the basis of information processing. Certain mechanisms can be blocked in the model. Simulations under these modified conditions provide predictions as to how activity patterns in the living animal should change when the same mechanisms are blocked there. Checking the predictions on the living animal then provides insights into mechanisms of neuronal information processing which are difficult to achieve with conventional experimental approaches.

Outlook

The methods, models and results described here are still far away from providing final answers to the questions above. Nevertheless, they provide a new approach to study the interplay of many parameters, which determine and influence the activity of a nerve cell – from cellular properties to synaptic connection patterns. This enables us to make testable predictions. For the next few years, we aim to identify all regions of the brain, which are associated with the movement and sensing of a whisker, and expanding the existing computer model of the somatosensory cortex by these brain regions. This project is supported by the European Research Council. In the long-term, this approach should allow simulations, which come very close to the situation of the rat at a gap.

es den Forschern, überprüfbare Vorhersagen zu machen. Wir haben uns für die nächsten Jahre zum Ziel gesetzt, alle Hirnregionen, die mit der Bewegung und Berührung eines Tasthaares assoziiert sind, zu identifizieren und das bereits bestehende Computermodell des somatosensorischen Kortex um diese Hirnregionen zu erweitern. Dieses Projekt wird vom European Research Council unterstützt. Langfristig sollte dieses Vorgehen Simulationen erlauben, die der Situation einer Ratte am Graben sehr nahe kommen. Darüber hinaus wird die beschriebene Kombination von Experiment, Netzwerkrekonstruktion und Simulation helfen, Gesetzmäßigkeiten zu beschreiben, die über die Grenzen des Modellsystems hinaus Gültigkeit haben und so zum Verständnis des menschlichen Gehirns beitragen.

Furthermore, the combination of experiments, network reconstructions and simulations will help to describe the principles which – beyond the limitations of the model – contribute to understand the human brain.

Contact | Kontakt

Dr. Marcel Oberlaender
Group Leader
Max Planck Research Group
In Silico Brain Sciences
Phone +49 (0)228 9656-380
marcel.oberlaender@caesar.de

References | Literaturhinweise

- [1] Landau, I.D., Egger, R., Dercksen, V.J., Oberlaender, M. & Sompolinsky, H. (2016) "Impact of structural heterogeneity on excitation-inhibition balance in cortical networks" *Neuron* 92, 1106-1121
- [2] Egger, R., Schmitt, A.C., Wallace, D.J., Sakmann, B., Oberlaender, M. & Kerr, J.D. (2015) "Robustness of sensory-evoked excitation is increased by inhibitory inputs to distal apical tuft dendrites" *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 112, 14072 - 14077
- [3] Narayanan, R.T., Egger, R., Johnson, A.S., Mansvelter, H.D., Sakmann, B., De Kock, C.P.J. & Oberlaender, M. (2015) "Beyond columnar organization: cell type- and target layer-specific principles of horizontal axon projection patterns in rat vibrissal cortex" *Cerebral Cortex* 25, 4450 - 4468
- [4] Egger, R., Dercksen, V.J., Udvary, D., Hege, H.-C. & Oberlaender, M. (2014) "Generation of dense statistical connectomes from sparse morphological data" *Frontiers in Neuroanatomy* 8, 1 - 18
- [5] Meyer, H.S., Egger, R., Guest, J.M., Foerster, R., Reissl, S. & Oberlaender, M. (2013), "Cellular organization of cortical barrel columns is whisker-specific" *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 110, 19113 - 19118
- [6] Egger, R., Narayanan, R.T., De Kock, C.P.J. & Oberlaender, M. (2012), "3D reconstruction and standardization of the rat vibrissal cortex for precise registration of single neuron morphology" *PLoS Computational Biology* 8, 1 - 18
- [7] Oberlaender, M.; Ramirez, A.; Bruno, R.M. (2012) "Sensory experience restructures thalamocortical axons during adulthood" *Neuron* 74, 648 - 655





How fruit flies navigate

Johannes Seelig | Max Planck Research Group: Neural Circuits

Fruit flies solve complex behavioral tasks with a small brain of only about 100 000 neurons. Many of the behavioral problems that the fly faces are similar to those any other animal encounters. Flies navigate for example in a multisensory world to find food sources or avoid predators by integrating sensory cues with information about their internal state.

Many of the molecular building blocks of the nervous system of the fly, such as the different neurotransmitter systems, are evolutionarily

Wie Fruchtliegen navigieren

Fruchtliegen lösen komplexe Verhaltensaufgaben mit einem kleinen Gehirn aus nur etwa 100.000 Neuronen. Viele Verhaltensprobleme, denen sich die Fliege gegenüberstellt, treten in ähnlicher Weise auch bei allen anderen Tieren auf. Fliegen navigieren, zum Beispiel um Nahrungsquellen zu finden, indem sie multisensorische Signale aus der Umgebung mit Informationen über ihren inneren Zustand vernetzen.

Viele der molekularen Bausteine des Nervensystems der Fliege, zum Beispiel die verschiedenen

conserved and shared with those of vertebrates. Overall, an estimated 60% of genes are conserved between humans and flies. Given the similar behavioral challenges as well as the similar molecular constituents, finding similarities at the level of neural circuits would not be entirely surprising.

The fly brain is very compact: there are only a few synapses between sensory input and motor output, permitting a comprehensive investigation of the networks that integrate and transform sensory and motor signals. While there are other animals with similarly small nervous systems, the tractability of the fly brain stems not primarily from its low numerical complexity, but mostly from its genetic accessibility. The ease with which genetic manipulations can be carried out in the fly have led to the production of a large number of fly lines that allow access to well defined populations of neurons throughout the brain. These lines allow the reproducible labeling of small, genetically defined, populations of neurons. With these lines the same population of neurons can be studied using an array of different techniques: structural information from light or electron microscopy can be combined with functional data from calcium imaging, patch clamp recordings or optogenetic stimulation combined with behavioral assays. The goal of studying neural circuits in the fly is to find principles of neural circuit function that will contribute to our understanding of the nervous system across species.

The head direction system in the fly brain

During my postdoc in Vivek Jayaraman's lab at the Janelia Research Campus we developed an experimental framework (Figure 1a, b) that enabled us to monitor neural activity in populations of identified neurons throughout the brain of fruit flies during visually guided behavior in a virtual reality arena [1-3]. With this setup neural recordings as well as optogenetic manipulations at subcellular resolution can be combined with behavioral experiments in head-fixed animals. To this end flies are inserted into a holder that allows them to freely move their wings and legs and at the same time the

Transmittersysteme, entsprechen denen von Wirbeltieren. Insgesamt finden sich zu geschätzten 60 % der Gene von Menschen Entsprechungen bei der Fliege. Angesichts dessen, dass sich sowohl die das Verhalten betreffenden Herausforderungen als auch die molekularen Bausteine ähneln, ist es nicht überraschend, dass sich auch auf der Ebene der neuronalen Schaltkreise Ähnlichkeiten finden.

Das Fliegenhirn ist sehr kompakt: Es liegen nur wenige Synapsen zwischen dem Eingang von Sinnesreizen und deren Übersetzung in eine motorische Antwort, was eine umfassende Erforschung der Netzwerke, die sensorische und motorische Signale vernetzen und umwandeln, erlaubt. Zwar haben auch andere Tiere ähnlich kleine Nervensysteme, die Erforschbarkeit des Fliegenhirns resultiert jedoch nicht nur aus seiner geringen numerischen Komplexität, sondern vor allem aus seiner genetischen Zugänglichkeit. Die Tatsache, dass bei der Fliege relativ einfach genetische Manipulationen vorgenommen werden können, hat zur Erzeugung einer großen Anzahl von Fliegenlinien geführt, mit deren Hilfe überall im Gehirn genau definierte Neuronenpopulationen angesteuert werden können. Diese Linien ermöglichen die reproduzierbare Markierung kleiner, genetisch definierter Neuronenpopulationen, so dass sich dieselben Nervenzellen mit verschiedenen Techniken untersuchen lassen: Strukturelle Informationen aus der Licht- oder Elektronenmikroskopie können mit funktionellen Daten aus der Kalzium-Bildgebung kombiniert werden, Ergebnisse der Patch-Clamp Methode oder der optogenetischen Stimulation lassen sich mit Verhaltenstests verknüpfen. Ziel dieser Untersuchung bei der Fliege ist es, allgemeine Grundprinzipien der Funktionsweise neuronaler Schaltkreise zu erforschen und so unser Verständnis des Nervensystems zu verbessern.

Das Kopfrichtungssystem im Fliegenhirn

Während meiner Postdoc-Zeit in Vivek Jayaramans Labor am Janelia Research Campus entwickelten wir einen Versuchsaufbau (Abbildung 1a, b), mit dessen Hilfe wir die neuronale Aktivität in Populationen identifizierter Neuronen im Gehirn von Fruchtflie-

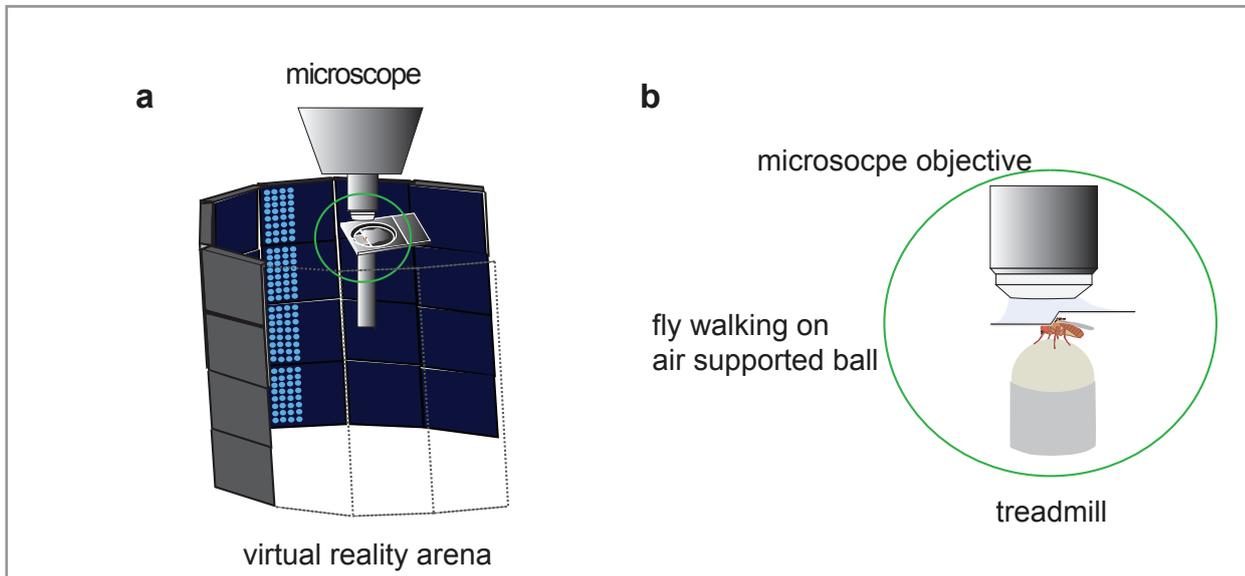


Figure 1. a. Holder which positions the fly in the virtual reality setup under the microscope.
b. Schematic of a fly walking on an air supported ball.

Abbildung 1. a. Halterung, in der die Fliege im Virtual Reality-Versuchsaufbau unter dem Mikroskop positioniert wird.
b. Schematische Darstellung einer Fliege, die sich auf einem luftgelagerten Ball fortbewegt.

head capsule of the fly is opened and the brain is accessed with a microscope.

We used this preparation to investigate neural circuits in the central complex (Figure 2a), a highly structured recurrent network in the center of the fly brain. In this structure, we identified subsets of neurons that represent visual features across the fly's field of view. The receptive fields of these so called ring neurons share characteristics with simple cells in the mammalian visual cortex [3], such as excitatory and inhibitory subfields as well as orientation tuning. These characteristics are thought to be ideally suited to efficiently extract behaviorally relevant information from a visual scene. Different genetically identified classes of these ring neurons represent different parts of the fly's field of view and together tile the fly's visual space. At the same time, the dendrites of ring neurons arborize in different areas of a glomerular structure associated with the central complex (the so called lateral triangle) in a retinotopic fashion. From this dendritic retinotopic map the ring neurons project with their ring shaped axons

gen während visuell gesteuerter Verhaltensweisen in einer virtuellen Realität beobachten konnten [1-3]. Mit diesem Versuchsaufbau können Aufnahmen neuronaler Aktivität sowie optogenetische Manipulationen mit subzellulärer Auflösung mit Verhaltensexperimenten kombiniert werden. Zu diesem Zweck werden die Fliegen in einer Halterung positioniert, in der sie ihre Flügel und Beine frei bewegen können, dann wird die Kopfkapsel der Fliege geöffnet und das Gehirn mit einem Mikroskop untersucht.

Mit Hilfe dieses Aufbaus untersuchten wir neuronale Schaltkreise im Zentralkomplex (Abbildung 2a), einem hochstrukturierten Netzwerk in der Mitte des Fliegengehirns. In dieser Struktur identifizierten wir Neuronenuntergruppen, die visuelle Merkmale im Gesichtsfeld der Fliege abbilden. Die rezeptiven Felder dieser sogenannten Ringneuronen weisen Eigenschaften auf, wie sie auch bei Zellen im visuellen Cortex von Säugetieren auftreten [3], zum Beispiel exzitatorische und inhibitorische Subfelder und Empfindlichkeit gegenüber der Orientierung von Linien. Solche rezeptiven Felder eignen sich für die effiziente Extraktion verhaltensrelevanter

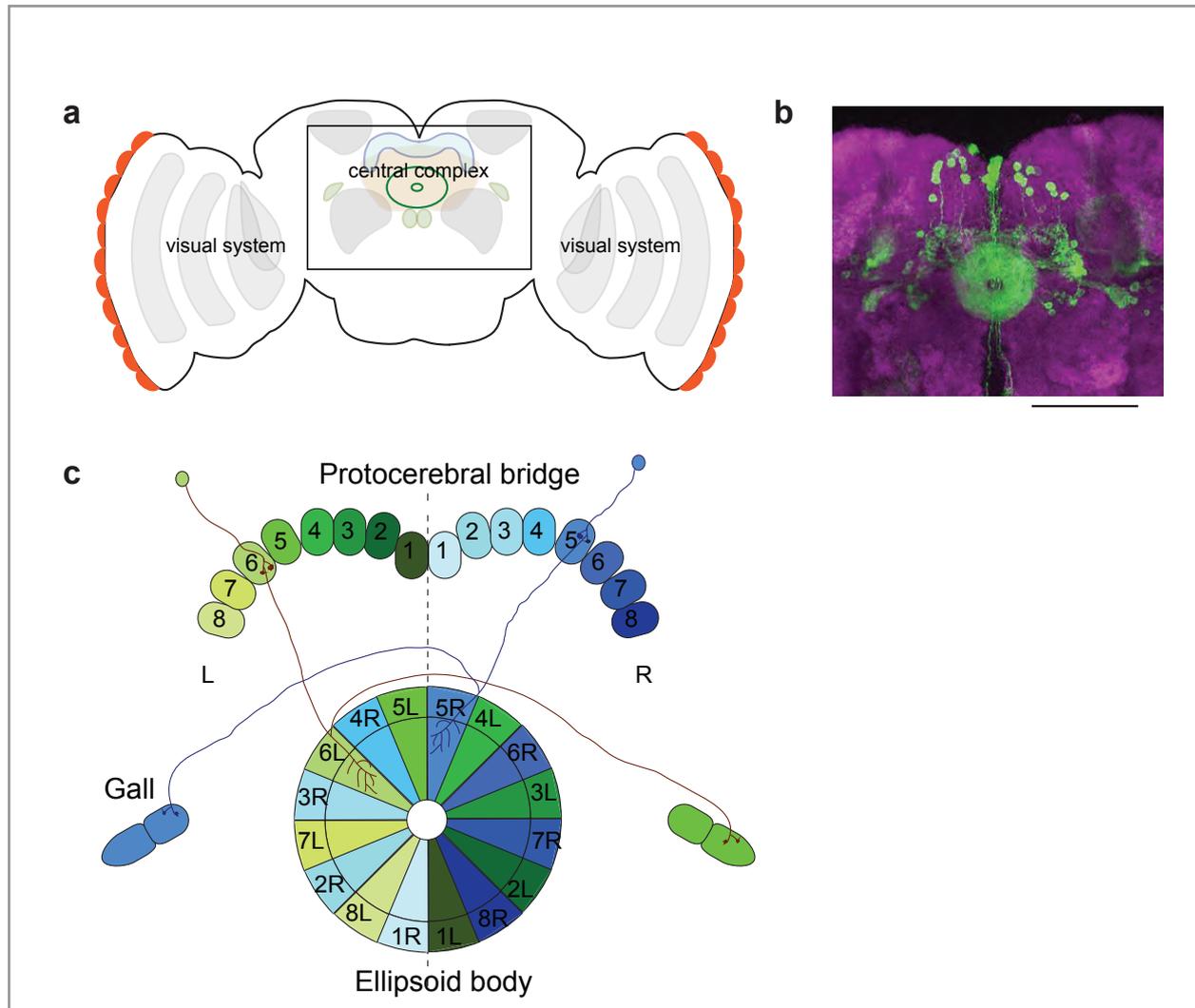


Figure 2. a. Schematic of the fly brain with central complex. b. Wedge neurons (representing heading direction) in the central complex (green), Scale Bar 20 μ m. c. Schematic of wedge neurons in the ellipsoid body and neighboring brain areas.

Abbildung 2. a. Schematische Darstellung des Fliegenhirns mit dem Zentralkomplex. b. Keilneuronen (welche die Bewegungsrichtung abbilden) im Zentralkomplex (grün), Maßstabsbalken 20 μ m. c. Schematische Darstellung von Keilneuronen im Ellipsoidkörper und benachbarten Hirnarealen.

to a structure called the ellipsoid body, a toroidal neuropil in the center of the fly brain (Figure 2a, b).

There, the ring neurons intersect with a second class of neurons, the so called wedge neurons (Figure 2b, c). The dendrites of these wedge neurons together tile the ellipsoid body (Figure 2c). We found that these wedge neurons play a role in spatial orientation and orientation memory similar to mammalian head direction cells [4].

Informationen aus der Umgebung. Verschiedene genetisch identifizierte Klassen dieser Ringneuronen bilden unterschiedliche Teile des Gesichtsfeldes der Fliege ab, wobei sie zusammen das gesamte Gesichtsfeld abdecken. Gleichzeitig verzweigen sich die Dendriten der Ringneuronen in einer mit dem Zentralkomplex assoziierten glomerulären Struktur. Dort bilden sie eine Art Karte, aus der die Ringneuronen mit ihren ringförmigen Axonen zu einer als Ellipsoidkörper bezeichneten Struktur

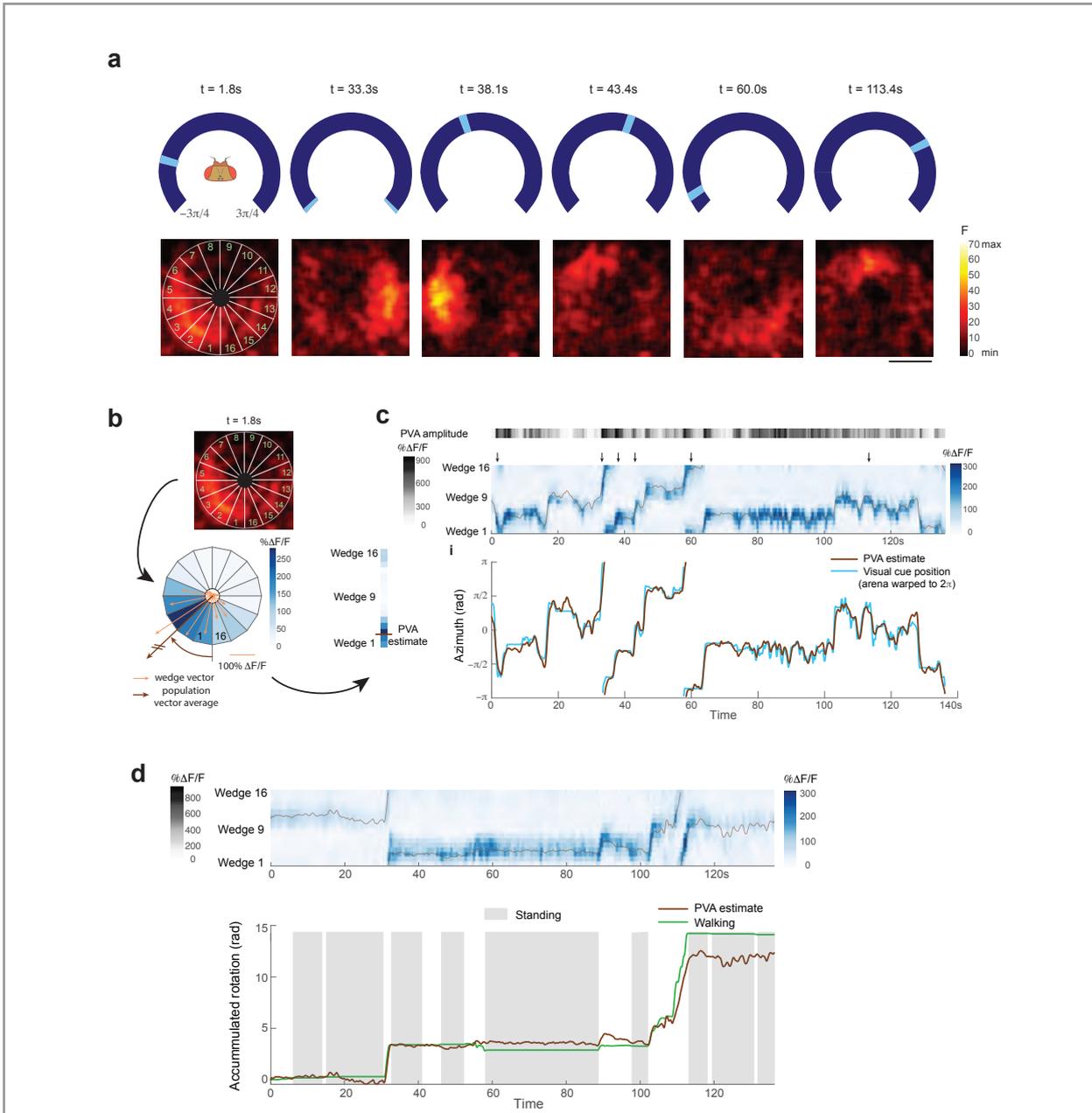


Figure 3. a. Calcium images of wedge neurons in the brain of a fly walking in a virtual reality setup together with the position of the pattern on the display (corresponding to the fly's walking direction in virtual reality). b. Extracting a population vector average which encodes the direction in which the fly is walking. c. Comparison of a prediction of the fly's virtual walking direction based on imaging data and actual pattern position. d. Same as c for a fly walking and standing in darkness.

Abbildung 3. a. Kalzium-Imaging-Aufnahmen von Keilneuronen im Gehirn einer sich in einem Virtual Reality-Versuchsaufbau fortbewegenden Fliege zusammen mit der Position des Musters auf dem Display (entsprechend der Laufrichtung der Fliege in der virtuellen Realität). b. Extraktion eines Populationsvektordurchschnitts, der die Richtung, in welche die Fliege läuft, codiert. c. Vergleich der Vorhersage der Laufrichtung der Fliege in der virtuellen Realität auf der Grundlage von Bildgebungsdaten und der tatsächlichen Musterposition. d. Wie c bei einer sich im Dunkeln fortbewegenden bzw. sich nicht fortbewegenden Fliege.

Head direction cells integrate visual and self motion cues for representing an animal's heading. Using two-photon calcium imaging in *Drosophila melanogaster* walking in a virtual reality arena we demonstrated that visual and self-motion cues are combined in these wedge neurons. This neural population encodes the fly's walking direction relative to its environment (Figure 3a-c), tracking visual landmarks when available and relying on self-motion cues in darkness (Figure 3d). When the animal is stationary, a representation of its orientation is maintained through persistent activity (Figure 3d), a potential substrate for short-term orientation memory. Both the function and anatomical arrangement of this network are reminiscent of ring attractor models for head direction systems as originally developed for the mammalian system.

Functional circuit mechanisms in the head direction system

What can we learn from this system in the fly? The function and structure of this circuit is intriguingly similar to basic computational models that have been proposed for the description of much larger navigational systems in the mammalian brain. The fly brain seems to offer a compact and comprehensively accessible implementation of a more broadly relevant network motif. While several different architectures have been proposed in theoretical works, it is not known on what theoretical grounds these different implementations could be distinguished. In the fly, we now have a system where we can study a specific biophysical implementation of the ring attractor network. As a first step towards elucidating the specific circuit mechanisms which underlie the directional encoding in the fly, we addressed the question of how the head direction signal is updated in concert with the animal's turning activity.

In this context we found a cell type that intersects with ring neurons as well as wedge neurons [5]. In the ellipsoid body itself the arborization pattern of these neurons is similar to that of wedge neurons. Outside the ellipsoid body these neurons project to

– einem toroidalen Neuropil im Zentrum des Fliegengehirns – projizieren (Abbildung 2a, b).

Dort überschneiden sich die Ringneuronen mit einer zweiten Klasse von Neuronen, den sogenannten Keilneuronen (Abbildung 2b, c). Die Dendriten dieser Keilneuronen überdecken gemeinsam den Ellipsoidkörper (Abbildung 2c). In unseren Experimenten hat sich herausgestellt, dass diese Keilneuronen bei der räumlichen Orientierung und dem Orientierungsgedächtnis eine ähnliche Rolle spielen wie die Kopfrichtungszellen bei Säugtieren [4]. Kopfrichtungszellen vernetzen visuelle und Eigenbewegungssignale, um die Bewegungsrichtung eines Tieres abzubilden. Mit Hilfe der Zwei-Photonen-Kalzium-Bildgebung haben wir bei *Drosophila melanogaster*, die sich in einer virtuellen Realität fortbewegte, gezeigt, dass visuelle und Eigenbewegungssignale in diesen Keilneuronen kombiniert werden. Diese neuronale Population kodiert die Laufrichtung der Fliege relativ zu in der Umgebung (Abbildung 3a-c) vorhanden visuellen Orientierungspunkten und verlässt sich in der Dunkelheit auf Eigenbewegungssignale (Abbildung 3d). Bewegt sich das Tier nicht fort, wird seine Orientierung durch persistierende Aktivität, ein potentielles Substrat für das Kurzzeit-Orientierungsgedächtnis, abgebildet (Abbildung 3d). Sowohl die Funktion als auch die anatomische Anordnung dieses Netzwerkes erinnern an Ringattraktormodelle für Kopfrichtungssysteme, wie sie ursprünglich für das Säugtieresystem postuliert wurden.

Mechanismen der funktionellen Schaltkreise im Kopfrichtungssystem

Was können wir von diesem System lernen? Die Funktion und Struktur dieses Schaltkreises ähnelt in verblüffender Weise den theoretischen Modellen zur Beschreibung sehr viel größerer Navigationssysteme im Säugetiergehirn. Das Fliegengehirn scheint hier eine kompakte und umfassend zugängliche Implementierung eines Netzwerkmotivs von allgemeinerer Relevanz zu bieten. In theoretischen Arbeiten wurden unterschiedliche Architekturen solcher Netzwerk motive vorgeschlagen, es ist jedoch unklar, auf welchen theoretischen Grundlagen

bilaterally symmetric substructures of the central complex located on both sides of the fly brain. This population of neurons shows differential, unilaterally enhanced activity correlated with the animal's turning direction. These neurons encode heading direction as well as angular velocity and selectively represent turns in either the clockwise or counterclockwise direction. The turning-related activity of these neurons, together with the overall connectivity of the network, offer a mechanism for updating the fly's representation of its heading direction. The structural network features which enable this updating of the directional representation rely on recurrent loops as well as an angular shift between related populations of neurons, similar to network structures that have been proposed to underlie the rodent head direction system.

These results elucidate a basic mechanism which can explain many of the functional and structural features of the fly's head direction system and shows how a circuit can implement the complex computation of updating an internal representation of heading direction. It will be interesting to find out what function the many other cell types in these central brain structures perform and how their function is linked to the network structure.

Improved methods for calcium imaging in the fly

One problem in the investigation of the brain is the large number of highly interconnected neurons that are all active at the same time. Ideally, we would like to observe firing patterns of identified neurons throughout the brain with high spatiotemporal precision. The experiments described above relied on two-photon calcium imaging. In two-photon microscopy, a diffraction limited focal spot is scanned across the sample. To record an entire volume, each focal plane has to be scanned and the focal spot is then moved to the next plane until the entire volume has been traced.

However, for sparsely labeled samples, such as the small genetically identified populations of neurons in the fly brain, a large part of the scanned

eine Entscheidung zwischen diesen verschiedenen Modellen getroffen werden soll. Bei der Fliege können wir nun eine konkrete biophysikalische Implementierung eines Ringattraktornetzwerkes untersuchen.

In einem ersten Schritt zur Aufklärung der Schaltkreismechanismen, die der Richtungskodierung bei der Fliege zugrunde liegen, wandten wir uns der Frage zu, wie das Kopfrichtungssignal in Übereinstimmung mit der Drehbewegung des Tieres aktualisiert wird. In diesem Zusammenhang untersuchten wir einen Zelltyp, der sich sowohl mit Ringneuronen als auch mit Keilneuronen überschneidet [5]. In dem Ellipsoidkörper selbst ähnelt das Verzweigungsmuster dieser Neuronen dem der Keilneuronen. Außerhalb des Ellipsoidkörpers projizieren diese Neuronen zu bilateral symmetrischen Strukturen des Zentralkomplexes. Diese Neuronenpopulation weist eine einseitig verstärkte Aktivität auf, die mit der Richtung der Drehbewegung des Tieres korreliert. Diese Neuronen kodieren die Bewegungsrichtung und Winkelgeschwindigkeit und bilden Drehungen im oder gegen den Uhrzeigersinn selektiv ab. Gemeinsam mit der Gesamtkonnektivität des Netzwerkes stellt die drehungsbezogene Aktivität dieser Neuronen einen Mechanismus zur Aktualisierung der Bewegungsaktivität im Gehirn der Fliege dar. Die strukturellen Netzwerkmerkmale, welche diese Aktualisierung der Richtungsinformation ermöglichen, basieren auf Schleifen sowie auf einer Winkelverschiebung zwischen zusammenhängenden Neuronenpopulationen, ähnlich wie bei Netzwerkstrukturen, die Modellen für das Kopfrichtungssystem bei Nagern zugrunde liegen.

Diese Ergebnisse verdeutlichen einen grundlegenden Mechanismus, der viele der funktionellen und strukturellen Merkmale des Kopfrichtungssystems bei der Fliege erklären kann und zeigt, wie ein Schaltkreis die komplexe Berechnung der Aktualisierung einer inneren Abbildung der Bewegungsrichtung implementieren kann. Es wird interessant sein herauszufinden, welche Funktion die vielen anderen Zelltypen in diesen zentralen Hirnstrukturen haben und wie ihre Funktion mit der Netzwerkstruktur verknüpft ist.

volume is devoid of any labeled structures. A method developed by the lab of Na Ji at the Janelia Research Campus takes advantage of this fact [6]. Instead of scanning a point-like focus, as is done conventionally in two-photon microscopy, this method uses a pencil-like beam, a so called Bessel beam. While the lateral resolution is comparable to the one achieved with a point-like focus, the Bessel beam extends over several tens of micrometers in the axial direction. Instead of scanning each plane in a volume sequentially, as in conventional two-photon microscopy, an entire volume can be scanned within the time it would otherwise take to scan a single plane. What is lost compared with a sequentially scanned volume, is the axial resolution. However, for sparsely labeled samples, as we often find in the fly brain, the method is well suited to record large volumes at high frame rates with better signal to noise ratio.

Multisensory responses of a learning structure in the fly brain

In a first test in the fly brain in Na Ji's lab we applied this technique to the investigation of calcium signals in response to visual stimulation. In one experiment, we investigated calcium signals throughout the brain in response to stimulation with moving gratings. We observed that a brain structure that has been traditionally associated mainly with the processing and memory formation of olfactory signals, the mushroom bodies, showed surprisingly strong responses to the presentation of visual stimuli. This is consistent with recent observation from other groups that describe a segregation of olfactory and visual stimuli in the mushroom bodies using behavioral as well as genetic methods. These findings now open up multiple opportunities for investigating the processing and learning of multisensory signals in one of the best-understood brain structures in the fly.

Verbesserte Verfahren zur Kalzium-Bildgebung bei der Fliege

Ein Problem bei der Untersuchung des Gehirns ist die große Anzahl eng miteinander verknüpfter Neuronen, die alle zur selben Zeit aktiv sind. Idealerweise möchten wir die Aktivität identifizierter Neuronen im Gehirn mit hoher raumzeitlicher Präzision beobachten. Die zuvor beschriebenen Experimente basieren auf der Zwei-Photonen-Kalzium-Bildgebung. Bei der Zwei-Photonen-Mikroskopie wird die Probe mit einem beugungsbegrenzten Fokus abgetastet. Zur Erfassung des gesamten Volumens muss jede Brennebene gescannt werden; der Fokus wird dann weiter zur nächsten Ebene bewegt, bis er das gesamte Volumen abgetastet hat.

Bei selektiv markierten Proben, wie zum Beispiel den kleinen, genetisch identifizierten Neuronenpopulationen im Fliegenhirn, weist ein großer Teil des gescannten Volumens jedoch keine markierten Strukturen auf. Ein vom Labor von Na Ji am Janelia Research Campus entwickeltes Verfahren macht sich diese Tatsache zunutze [6]. Anstelle des Abtastens mit einem punktförmigen Fokus, wie es herkömmlicherweise bei der Zwei-Photonen-Mikroskopie erfolgt, kommt bei diesem Verfahren ein stiftartiger Strahl zum Einsatz, der sogenannte Bessel-Strahl. Zwar ist die laterale Auflösung mit der eines punktförmigen Fokus vergleichbar, der Bessel-Strahl erstreckt sich jedoch in axialer Richtung über mehrere zehn Mikrometer. Anders als bei der herkömmlichen Zwei-Photonen-Mikroskopie, wo die einzelnen Ebenen eines Volumens nacheinander gescannt werden, kann hier das gesamte Volumen innerhalb eines Zeitraums, der ansonsten für den Scan einer einzelnen Ebene nötig wäre, abgetastet werden. Was im Vergleich zu einem sequentiell gescannten Volumen verloren geht, ist die axiale Auflösung. Bei selektiv markierten Proben, wie wir sie häufig im Fliegenhirn vorfinden, eignet sich das Verfahren jedoch gut, um große Volumina bei hohen Bildraten mit einem besseren Signal-Rausch-Verhältnis zu erfassen.

Multisensorische Reaktionen einer lernenden Struktur im Fliegengehirn

Bei einem ersten Versuch am Fliegengehirn in Na Jis Labor wandten wir diese Technik zur Untersuchung der Kalziumsignale als Reaktion auf eine visuelle Stimulation an. In einem Experiment untersuchten wir Kalziumsignale im Gehirn als Reaktion auf eine Stimulation mit sich bewegenden visuellen Gittermustern. Wir beobachteten, dass eine Gehirnstruktur, die herkömmlicherweise vor allem mit der Verarbeitung und Speicherung olfaktorischer Signale assoziiert ist, die Pilzkörper, überraschend stark auf die Abbildung visueller Reize reagierte. Dies stimmt mit neueren Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen überein, die eine Trennung olfaktorischer und visueller Stimuli im Pilzkörper mittels verhaltensgestützter und genetischer Verfahren beschrieben haben. Diese Ergebnisse eröffnen nun zahlreiche Möglichkeiten zur Erforschung der Verarbeitung und des Erlernens multisensorischer Signale in einer der am besten verstandenen Gehirnstrukturen der Fliege.

Contact | Kontakt

Dr. Johannes Seelig
Group Leader
Max Planck Research Group
Neural Circuits
Phone +49 (0)228 9656-190
johannes.seelig@caesar.de

References | Literaturhinweise

- [1] Seelig, J.D., et al., Two-photon calcium imaging from head-fixed *Drosophila* during optomotor walking behavior. *Nat Methods*, 2010. 7(7): p. 535-40.
- [2] Seelig, J.D. and V. Jayaraman, Studying sensorimotor processing with physiology in behaving *Drosophila*. *Int Rev Neurobiol*, 2011. 99: p. 169-89.
- [3] Seelig, J.D. and V. Jayaraman, Feature detection and orientation tuning in the *Drosophila* central complex. *Nature*, 2013. 503(7475): p. 262-6.
- [4] Seelig, J.D. and V. Jayaraman, Neural dynamics for landmark orientation and angular path integration. *Nature*, 2015. 521(7551): p. 186-91.
- [5] Turner-Evans, D.B., Wegener S, Rouault, H., Franconville, R., Wolff, T., JSeelig, J.D., Druckmann, S., Jayaraman, V., eLife, accepted.
- [6] Lu, R., et al., Video-rate volumetric functional imaging of the brain at synaptic resolution. *Nat Neurosci*, 2017. 20(4): p. 620-628.





How artificial neural networks help to understand the brain

Jakob Macke | Max Planck Research Group: Neural Systems Analysis

How do populations of neurons compute? Bridging the gap between experimental data and models of neural dynamics and computation

A central goal in neuroscience is to understand the neural computations that give rise to perception, cognition, and behavior. Achieving this goal will be extremely challenging, as it will require us to link observations at multiple levels of description: We will need to understand how mechanisms at the cellular scale give rise to the dynamics of neural

Wie künstliche neuronale Netze helfen, das Gehirn zu verstehen

Wie verarbeiten Neuronenpopulationen Informationen? Wie können wir experimentelle Messungen mit Modellen neuronaler Dynamik verknüpfen?

Ein Hauptziel der Neurowissenschaft ist es zu verstehen, wie neuronale Systeme Informationen verarbeiten und damit die Grundlage von Wahrnehmung, Kognition und Verhalten legen. Dieses Ziel zu erreichen bedeutet eine enorme Herausforderung, da es die Verknüpfung von Beobachtungen auf verschie-

populations, how these dynamics implement computations, and how these computations control animal behavior.

Advances in neural and behavioral measurement techniques make it possible to measure these processes at unprecedented scale and resolution. However, it has also become clear that these technological advances alone will not be sufficient for understanding neural computation – rather, they need to be complemented with theories and models that allow one to interpret and link observations across multiple levels of description. Research in computational neuroscience has developed a cornucopia of models that aim to capture neural computations at different scales. These include biophysical models of how dendrites and neurons integrate their inputs, network models of the collective dynamics of neural populations, and normative theories that try to explain behavior – what should an animal do to optimally solve a task, and what does it do?

The central goal of the group Neural Systems Analysis is to understand how populations of neurons collectively process sensory input, perform computations and control behavior. The wealth of data from new neural and behavioral measurements is providing us with great opportunities for unraveling the principles of how populations of neurons compute. A crucial bottleneck in this endeavor has been the ability to link experimental measurements with quantitative models. To bridge this gap, we develop statistical approaches and machine learning algorithms for quantitatively linking theoretical models of neural dynamics and behavior with experimental data.

Statistical inference for biophysical models of neural dynamics

A particular focus of our work is to develop computational approaches that allow us to constrain biophysical models by measurements of neural activity. Biophysical models of single neurons, e.g. the famous Hodgkin-Huxley dynamics (Figure 1a), play a central role in computational neuroscience: In contrast to purely

denen Beschreibungsebenen erfordert: Wir müssen verstehen, wie zelluläre Mechanismen die Dynamik neuronaler Populationen bestimmen und wie dadurch neuronale Populationen Berechnungen ausführen können, die letztendlich das Verhalten von Tieren steuern.

Fortschritte im Bereich experimenteller Messtechniken ermöglichen die Erfassung dieser Prozesse in zuvor unerreichem Maßstab und Auflösung. Es stellte sich jedoch auch heraus, dass diese technologischen Fortschritte alleine für das Verständnis der neuronalen Informationsverarbeitung nicht genügen – sie müssen vielmehr durch Theorien und Modelle ergänzt werden, welche die Interpretation und Verknüpfung von Beobachtungen auf verschiedenen Beschreibungsebenen erlauben. Im Forschungsbereich Computational Neuroscience wurde eine Fülle an Modellen entwickelt, deren Ziel es ist, die neuronale Informationsverarbeitung auf verschiedenen Beschreibungsebenen zu erfassen, insbesondere biophysikalische Modelle von Dendriten und Neuronen, Netzwerkmodelle zur kollektiven Dynamik neuronaler Populationen und normative Theorien von Verhalten – was sollte ein Tier tun, um eine Aufgabe optimal zu lösen, und was tut es?

Die Arbeitsgruppe Neuronale Systemanalyse möchte verstehen, wie neuronale Populationen im Kollektiv sensorischen Input verarbeiten, Berechnungen ausführen und Verhalten steuern. Die Fülle an Daten neuronaler und verhaltensbezogener Messungen bietet großartige Möglichkeiten, die Prinzipien neuronaler Informationsverarbeitung zu verstehen. Ein entscheidendes Nadelöhr bei diesen Bestrebungen ist die Fähigkeit, experimentelle Messungen mit quantitativen Modellen zu verknüpfen. Um dieses Ziel zu erreichen, entwickeln wir statistische Methoden und Algorithmen des maschinellen Lernens zur quantitativen Verknüpfung theoretischer Modelle neuronaler Dynamik mit experimentellen Messungen.

Statistische Inferenz für biophysikalische Modelle der neuronalen Dynamik

Ein Schwerpunkt unserer Arbeit liegt auf der Ent-

phenomenological models, these models provide predictions about biophysical processes, linking the dynamics of ion channels in the cell membrane to the dynamics of membrane voltages and the generation of action potentials.

However, the rich dynamics of biophysical models comes at a cost: The relationship between empirically measurable features of their output (e.g. average number of action potentials in the Hodgkin-Huxley model) and model parameters (e.g. concentration of sodium channels in the cell) can be hard, or even impossible to assess. As a consequence, linking biophysical models to empirical observations of neural activity has been challenging: comparisons between models and data are either qualitative or rely on manual parameter tweaking, parameter-fitting using heuristics, or brute-force search [1]. Furthermore, parameter-fitting approaches typically return a single best-fitting parameter set, but do not characterize the entire space of parameter values that would be consistent with data.

We overcome this limitation by developing a general method to identify which parameters of complex single-neuron models are consistent with a given data-set. We tackle this goal by building on recent advances in Bayesian inference: the key idea is to simulate multiple data-sets from different parameters, and then to train a neural network which approximates the mapping from data to parameters (Figure 1b): In essence, we teach an artificial neural network to do statistics on neural models [2,3].

In Figure 1c, we illustrate the application of the approach to the Hodgkin-Huxley model of single neurons. On simulated data, estimated parameter-sets recover ground-truth parameters, and reveal the manifold of parameters for which the model exhibits the same behavior: the parameter-set is color-coded from blue to yellow, where regions in yellow (blue) correspond to very likely (unlikely) parameter values given the observed data. On *in vitro* recordings of membrane voltages from mouse

wicklung von rechnergestützten Methoden, welche uns die Eingrenzung mechanistischer Modelle durch Messungen der neuronalen Aktivität erlauben. Biophysikalische Modelle einzelner Neuronen, zum Beispiel die berühmte Hodgkin-Huxley-Dynamik (Abbildung 1a), spielen eine entscheidende Rolle in der Computational Neuroscience: Im Gegensatz zu rein phänomenologischen Modellen liefern diese Modelle Voraussagen über mechanistische Prozesse, welche die Dynamik von Ionenkanälen in der Zellmembran mit der Dynamik von Membranspannungen und der Erzeugung von Aktionspotentialen verknüpfen.

Die reichhaltigen nichtlinearen Dynamiken biophysikalischer Modelle haben jedoch ihren Preis: Die Beziehung zwischen empirisch messbaren Merkmalen ihres Outputs (zum Beispiel die Anzahl von Aktionspotentialen im Hodgkin-Huxley-Modell) und den Modellparametern (zum Beispiel Konzentration der Natriumkanäle in der Zelle) lässt sich meist nur schwer oder sogar überhaupt nicht analytisch erfassen. Demzufolge stellt die Verknüpfung biophysikalischer Modelle mit empirischen Beobachtungen der neuronalen Aktivität eine Herausforderung dar: Vergleiche zwischen Modellen und Daten sind entweder qualitativer Art oder basieren auf der manuellen Anpassung von Parametern, heuristischen Verfahren oder 'Brute-Force'-Suche [1]. Zudem liefern Methoden der Parameteranpassung typischerweise einen einzigen, am besten passenden Parametersatz, charakterisieren aber nicht den gesamten Raum der Parameterwerte, die mit den Daten übereinstimmen würden.

Wir wollen dieses Problem lösen, indem wir allgemein anwendbare Verfahren entwickeln, anhand derer sich feststellen lässt, welche Parameter komplexer Einzelneuronenmodelle mit dem jeweiligen Datensatz übereinstimmen. Wir versuchen dieses Ziel zu erreichen, indem wir uns Fortschritte bei der Bayesschen Statistik zunutze machen: Die Grundidee ist, multiple Datensätze von verschiedenen Parametern zu simulieren und dann ein neuronales Netzwerk zu trainieren, welches das Mapping von Daten zu Parametern approximiert (Abbildung 1b):

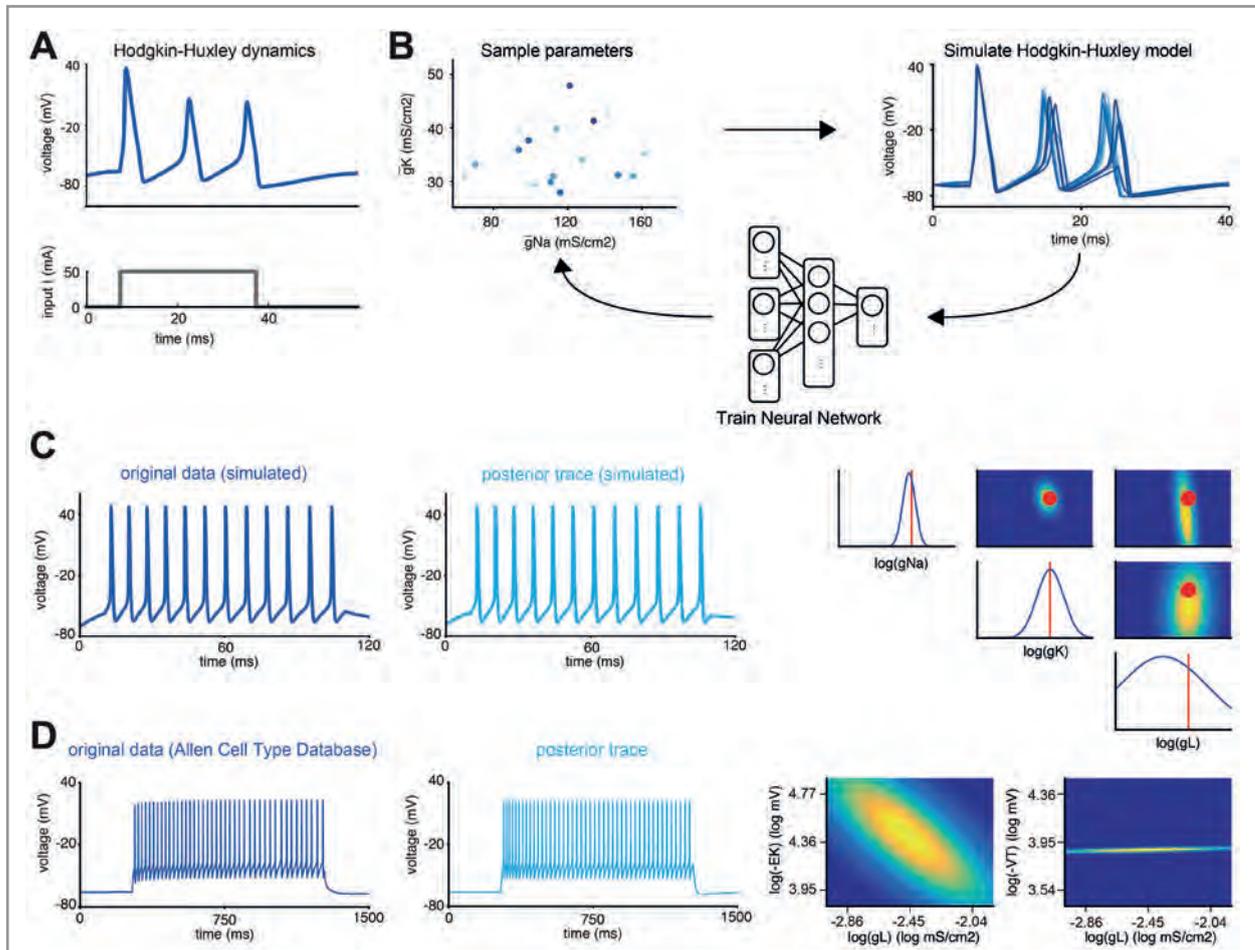


Figure 1. a. Simulation of a Hodgkin-Huxley model neuron. b. Illustration of approach with a Hodgkin-Huxley model: Given a number of parameter sets, the model generates voltage traces. An artificial neural network is trained on these simulated data. The goal is to be able to predict for novel traces (simulated or real recordings) which parameter regime of the model can produce matching traces. c-d. Application of the method to simulated data c. and in-vitro cell recordings from Allen Cell Type Database d. Voltage traces generated using parameters predicted by our method match the original data well in both cases. On the right is the space of parameter values that are predicted to match the original data. Note that for the case of the simulated data c., for which the true parameters are known, the inferred space of parameters attributes to the true parameters (in red) a high probability of underlying the data, confirming the success of the approach.

Abbildung 1. a. Simulation eines Hodgkin-Huxley-Modell-Neurons. b. Darstellung der Methode anhand eines Hodgkin-Huxley-Modells: Das Modell simuliert Messungen von Potenzialschwankungen von verschiedenen Parametersätzen. Ein künstliches neuronales Netzwerk wird mittels dieser simulierten Daten trainiert. Das Netzwerk lernt, anhand von (simulierten oder experimentellen) Messungen, vorherzusagen, welche Parameterregime des Modells solche Messungen erzeugen könnten. c-d. Anwendung der Methode auf simulierte Daten c. und in vitro-Zellregistrierungen aus der Allen Cell Type Database d. Simulierte Messungen, die anhand der durch unsere Methode vorausgesagten Parameter generiert wurden, entsprechen den Originaldaten in beiden Fällen genau. Rechts ist der Raum der Parameterwerte dargestellt, der laut Vorhersage den Originaldaten entspricht.

visual cortex (Allen Cell Type Database, illustration on cell 464212183), we recover biophysical parameters consistent with data, and voltage traces accurately match empirical data (Figure 1d). We expect that such statistical techniques will lead to key insights about the biophysical mechanisms underlying the observed neural recordings. In the future, we will apply this approach to dendritic calcium imaging data from hippocampal CA1 neurons (in collaboration with Stefan Remy, DZNE Bonn), with the goal of understanding the contribution of dendritic computations to the formation of place fields.

Our approach will enable neuroscientists to perform statistical inference on complex neuron models without having to design model-specific algorithms, closing the gap between biophysical and statistical approaches to single-neuron modelling.

Wir bringen einem künstlichen neuronalen Netzwerk bei, statistische Berechnungen über biologische neuronale Modelle durchzuführen. [2,3]

In Abbildung 1c stellen wir die Anwendung der Methode auf das Hodgkin-Huxley-Modell dar. Wir zeigen, dass die Methode erfolgreich die der Simulation zugrunde liegenden Parameter rekonstruieren kann und den Parameterraum identifiziert, für den das Modell dasselbe Verhalten ergibt: Der Parametersatz ist von blau bis gelb farbcodiert, wobei gelbe (blaue) Regionen sehr wahrscheinlichen (unwahrscheinlichen) Parameterwerten bei den jeweiligen beobachteten Daten entsprechen. An *in vitro*-Registrierungen von Membranspannungen im visuellen Kortex der Maus (Allen Cell Type Database, dargestellt an Zelle 464212183) rekonstruieren wir mit den Daten übereinstimmende biophysikalische Parameter; die simulierten Potenziale entsprechen dabei genau den empirischen Daten (Abbildung 1d). Wir gehen davon aus, dass solche statistischen Methoden uns wichtige Einblicke in die den beobachteten neuronalen Registrierungen zugrunde liegenden biophysikalischen Mechanismen ermöglichen. In Zukunft werden wir diese Methode auf Daten aus der Kalzium-Bildgebung bei Dendriten von CA1-Neuronen im Hippocampus anwenden (in Zusammenarbeit mit Stefan Remy vom DZNE Bonn); das Ziel ist hierbei zu verstehen, wie die Informationsverarbeitung von Dendriten zur Bildung von Ortsselektivität in Zellen beiträgt.

Mithilfe unseres Ansatzes können Neurowissenschaftler statistische Inferenzmethoden bei komplexen Neuronenmodellen anwenden, ohne modell-spezifische Algorithmen entwickeln zu müssen; auf diese Weise lässt sich eine Brücke zwischen biophysikalischen und statistischen Neuronenmodellen schlagen.



Contact | Kontakt

Dr. Jakob Macke

Group Leader

Max Planck Research Group

Neural Systems Analysis

Phone +49 (0)228 9656-170

jakob.macke@caesar.de

References | Literaturhinweise

[1] S Druckmann, Y Banitt, A Gidon, F Schürmann, H Markram, and I Segev. A novel multiple objective optimization framework for constraining conductance-based neuron models by experimental data. *Frontiers in Neuroscience*, 1, 2007.

[2] PJ Goncalves, J Lueckmann, G Bassetto, K Oecal, M Nonnenmacher, JH Macke. Flexible statistical inference for mechanistic models of neural dynamics. *Advances in Neural Information Processing Systems*, 2017

[3] G Papamakarios and I Murray. Fast epsilon-free inference of simulation models with bayesian conditional density estimation. *Advances in Neural Information Processing Systems*, 2016.



Observing proteins at work

Proteine bei der Arbeit beobachten

Elmar Behrmann | Max Planck Research Group: Structural Dynamics of Proteins

Proteins are the basic building blocks and engines of our cells. To better understand their way of functioning, scientists decoded numerous protein structures in the past. However, gaps still remain in our understanding, because proteins operate like engines: to carry out their work, they must move. Thus, to understand exactly how proteins work, scientists must also examine their movements. Scientists from the Structural Dynamics of Proteins Research Group have developed a method for observing proteins at work in their natural environment. This could contribute to the better

Eiweißmoleküle, auch Proteine genannt, sind die Grundbausteine und Maschinen unserer Zellen. Um ihre Funktionsweisen besser zu verstehen, haben Wissenschaftler in der Vergangenheit eine Vielzahl von Proteinstrukturen entschlüsselt. Trotzdem bleibt das Verständnis der Arbeitsweise der Eiweißmoleküle lückenhaft, denn Proteine funktionieren ähnlich wie Maschinen: um ihre Arbeit zu verrichten, müssen sie sich bewegen. Um zu verstehen, wie genau die Proteine arbeiten, müssen Wissenschaftler sich also auch ihre Bewegungen ansehen. Forscher aus der Arbeitsgruppe

understanding of diseases and the development of targeted drugs with fewer side effects in the future.

The movement of proteins arises both on the level of individual amino acids, the building blocks of a protein, and between entire areas within the protein, known as domains. Electron microscope experiments enable us to record these movements and show them in three-dimensional structures. This is important for the development of innovative drugs, for example, as we must first understand how a protein is active before we can influence it effectively. Drugs can help us to switch off overactive proteins, and thereby curb infections, or to stimulate insufficiently active proteins, for example insulin receptors. Most drugs available today either switch their target proteins off or on completely. Thus, it is often vitally important to define the dosage precisely to achieve the desired effect and cause as few side effects as possible.

To be able to carry out their activities, most proteins must go through several functional states. The progression from one functional state to the next requires the protein to undergo controlled changes in its three-dimensional structure, known as conformational changes. The motor proteins found in our muscles, the myosins, are a good example of this (Figure 1).

Proteins, like the aforementioned myosins, are hierarchical in structure and consist of several domains which often assume specific functions in the protein (Figure 2). The individual domains consist of defined structural elements, in particular helices (illustrated as cylinders), β -strands (illustrated as rods) and loops. The structural elements are defined by the sequence of the protein's individual amino acids. However, the amino acids themselves are also composed of smaller components, namely atoms, in particular carbon, hydrogen and nitrogen. Like all atoms, the atoms of the individual amino acids are in constant (thermal) motion. These movements are subject to the laws of probability and can trigger defined changes in the amino acids under certain conditions. These, in turn, can lead to changes in the

„Strukturelle Dynamik von Proteinen“ haben eine Methode entwickelt, Proteine in ihrer natürlichen Umgebung bei der Arbeit zu beobachten. Dies könnte in Zukunft dazu beitragen, Krankheiten besser zu verstehen und gezielt Medikamente mit weniger Nebenwirkungen zu entwickeln.

Die Bewegung von Proteinen geschieht sowohl auf der Ebene einzelner Aminosäuren, den Bausteinen eines Proteins, als auch zwischen ganzen Bereichen, den sogenannten Domänen, innerhalb des Proteins. Elektronenmikroskopische Experimente erlauben es uns, diese Bewegungen zu erfassen und in dreidimensionalen Strukturen darzustellen. Dieses ist wichtig, zum Beispiel für die Entwicklung neuartiger Medikamente, da wir erst verstehen müssen, wie ein Protein aktiv ist, bevor wir es sinnvoll beeinflussen können. Medikamente können uns helfen, überaktive Proteine auszuschalten und so beispielsweise Entzündungen einzudämmen oder zu wenig aktive Proteine, wie etwa Insulinrezeptoren, zu stimulieren. Die meisten heute erhältlichen Medikamente schalten jedoch ihre Zielproteine entweder komplett an oder aus. Daher kann es lebenswichtig sein, dass die Dosis genau eingestellt wird, um die gewünschte Wirkung zu erhalten und möglichst wenig Nebenwirkungen.

Damit sie ihre Aktivität ausüben können, müssen die meisten Proteine mehrere funktionelle Zustände durchlaufen. Um von einem funktionellen Zustand zum nächsten zu gelangen, sind also kontrollierte Änderungen der dreidimensionalen Struktur, sogenannte Konformationsänderungen, des Proteins notwendig. Ein gutes Beispiel hierfür sind die Motorproteine unserer Muskeln, die Myosine (Abbildung 1).

Proteine, wie unsere Myosine, sind hierarchisch aufgebaut und bestehen aus mehreren Domänen, welche häufig spezifische Funktionen im Protein übernehmen (Abbildung 2). Die einzelnen Domänen bestehen wiederum aus definierten Strukturelementen, insbesondere aus Helices (dargestellt als Zylinder), Faltblättern (dargestellt als Stäbchen) sowie Schleifen. Die Strukturelemente wiederum

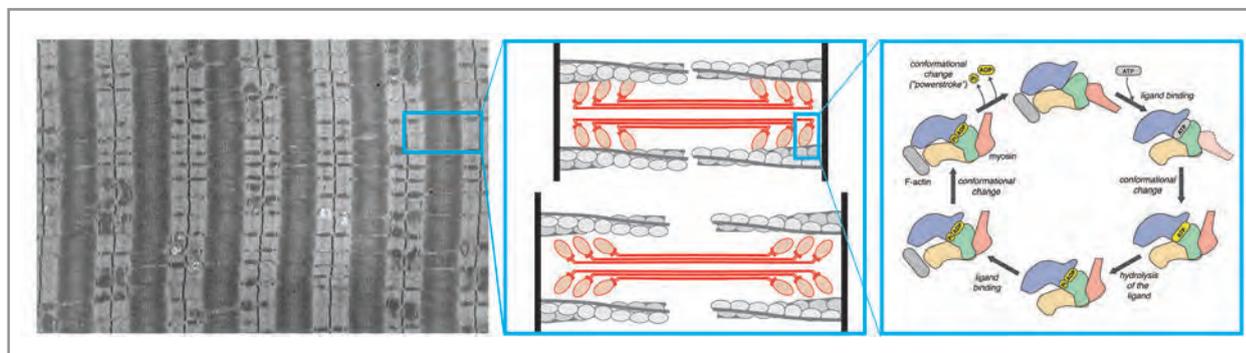


Figure 1. Example of the muscle motor myosin: Our proteins must move to fulfill their biological tasks. The contractile sarcomere is the smallest functional unit in our muscles. The contraction of these sarcomeres depends on a strictly regulated conformational change in the motor protein myosin (shown in red in the lower right corner image), known as the power stroke. This causes the myosin heads to change their conformation considerably and to move the ends of the sarcomeres towards each other. Thus, the head region of the myosin in particular must assume different conformations to ensure the contraction of the muscle. Illustration modified from [1].

Abbildung 1. Beispiel des Muskelmotors Myosin: Unsere Proteine müssen sich bewegen, um ihre biologische Aufgabe zu erfüllen. Kleinste funktionelle Einheit unserer Muskeln sind die kontraktile Sarkomere. Die Kontraktion dieser Sarkomere hängt von einer streng regulierten Konformationsänderung, dem sogenannten Kraftschlag, im Motorprotein Myosin ab (im Bild rechts unten in rot dargestellt). Dieser führt dazu, dass die Myosin Köpfe ihre Konformation stark verändern und dadurch die Enden des Sarkomeres aufeinander zu bewegen. Somit ist es insbesondere die Kopfregion des Myosins, welche verschiedene funktionelle Zustände einnehmen muss, um eine Kontraktion des Muskels zu gewährleisten. Abbildung nach [1].

relative arrangement of the secondary structural elements which result ultimately in defined conformational changes in the protein.

How can electron microscopy help us to gain a better understanding of the complex structural dynamics of proteins that unfold at different scales? With electron microscopy, it is possible to work with samples containing a protein in several conformations and nonetheless reconstruct high-resolution three-dimensional structures.¹ Hence, electron microscopy enables us to observe proteins at work, so to speak. For example, we were able to uncover the individual functional states of an active human ribosome in 3D (Behrmann et al., 2015).

In this study, we were not only able to show that, despite the conformational variability, it is possible to recognize individual functional states and elucidate

werden durch die Abfolge der einzelnen Aminosäuren des Proteins definiert. Aber auch die jeweiligen Aminosäuren sind aus kleineren Bausteinen zusammengesetzt, nämlich aus Atomen, vor allem Kohlenstoff, Wasserstoff und Stickstoff. Wie alle Atome sind auch die Atome der einzelnen Aminosäuren in ständiger (thermischer) Bewegung. Diese Bewegungen unterliegen den Gesetzen der Wahrscheinlichkeit und können unter bestimmten Umständen definierte Veränderungen in den Aminosäuren auslösen. Diese wiederum können zu Änderungen in der relativen Anordnung der Sekundärstrukturelemente führen, welche schlussendlich in deutlichen Konformationsänderungen des Proteins resultieren.

Wie kann uns Elektronenmikroskopie helfen, die komplexe, sich über mehrere Größenordnungen abspielende, strukturelle Dynamik von Proteinen

1 (Hintergründe zur Einzelpartikelrekonstruktion können Sie im Jahresbericht 2014 nachlesen)

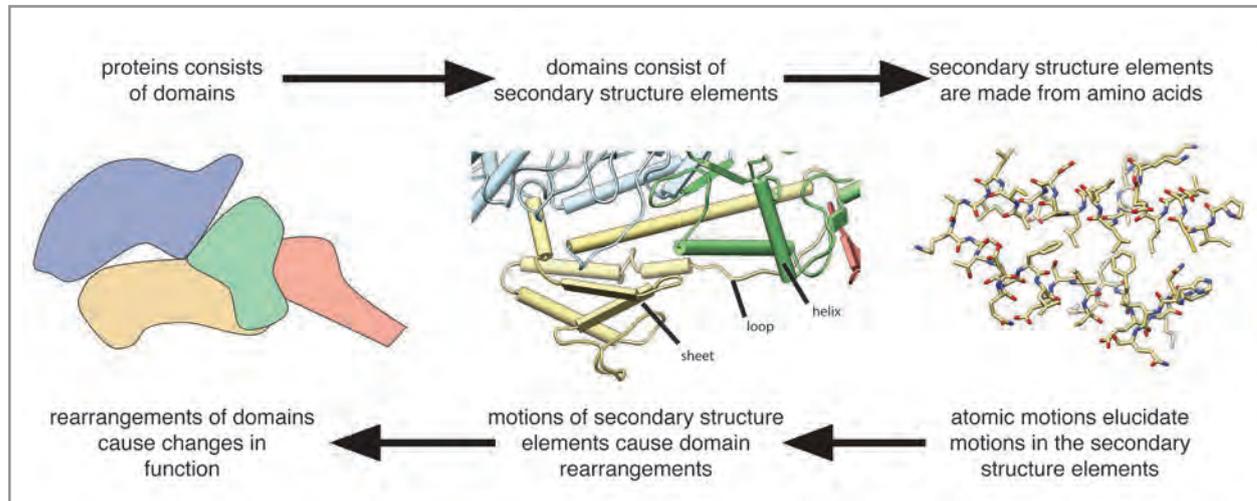


Figure 2. Proteins are hierarchical in structure and their conformational changes also arise on a hierarchical basis. Schematic representation of the four domains that compose a typical myosin head. The individual domains, for example the yellow domain, consist of a defined sequence of helices, strands and loops. These secondary structures are themselves defined by their primary structure, their amino acid sequence.

Abbildung 2. Proteine sind hierarchisch aufgebaut, und auch ihre Konformationsänderungen erfolgen hierarchisch. Schematische Darstellung der vier Domänen, aus welchen ein typischer Myosinkopf zusammengesetzt ist. Die einzelnen Domänen, wie zum Beispiel die gelb eingezeichnete Domäne, bestehen aus einer definierten Anordnung von Helices, Faltblättern und Schleifen. Diese Sekundärstrukturelemente wiederum sind durch ihre Primärstruktur, ihre Aminosäureabfolge, definiert.

them at high resolution. Indeed, we were also able to show that "structure" is not the only thing that defines a protein: in several areas, the ribosome showed a locally defined "melting" of its structure for facilitating the transition from one state to the next. How were we able to recognize this? It was only by comparing states originating from one and the same sample and measurement that we were able to exclude the possibility that observed differences were caused by variations in the sample preparation. Moreover, with our strategy, it was not necessary to stabilize and isolate individual functional states using biochemical or genetic manipulation. In this way, we were able to avoid the undesired side effects of such manipulations. For these two reasons, we are also able to recognize and interpret subtle differences between conformations of individual amino acids. We were therefore able to identify the local absence or invisibility of individual amino acids in a functional state. This enabled us to estimate the mechanistic contribution of these components and establish,

besser zu verstehen? In der Elektronenmikroskopie ist es möglich, mit Proben zu arbeiten, welche ein Protein in mehreren Konformationen enthält, und dennoch hochaufgelöste dreidimensionale Strukturen zu rekonstruieren¹. Die Elektronenmikroskopie erlaubt es uns somit, Proteinen sozusagen bei der Arbeit zuzuschauen. Zum Beispiel konnten wir so die einzelnen funktionellen Zustände eines aktiven humanen Ribosoms in dreidimensionalen Bildern darstellen [2].

In dieser Studie konnten wir nicht nur zeigen, dass es in der Tat möglich ist, trotz konformeller Variabilität einzelne funktionelle Zustände zu erkennen und sie mit hoher Auflösung aufzuklären. Vielmehr konnten wir auch zeigen, dass nicht nur „Struktur“ ein Protein definiert: in mehreren Bereichen zeigte das Ribosom eine lokal definierte Auflösung seiner Struktur, um den Übergang von einem in den nachfolgenden Zustand zu begünstigen. Wie konnten wir dieses erkennen? Nur wenn

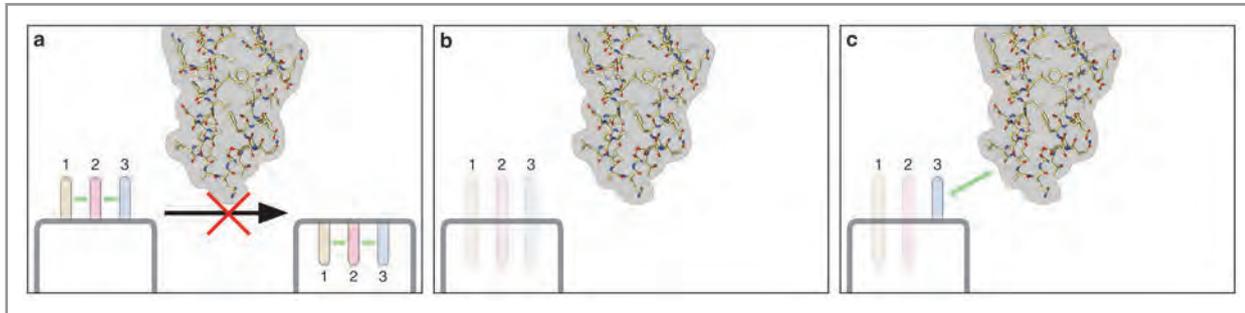


Figure 3. Transition between two functional states – toy example of molecular mechanisms. Let us assume that a prerequisite of the transition from state A to state B is the movement of a loop element with three amino acids (yellow, pink and blue) past a static helix-loop-helix element (gray). (a) This movement is not possible in the initial state (all three amino acids “up”), as there is not sufficient space for the passage. (b) If we observe a state A in the electron microscope, in which all three amino acids are not visible but assume both the “up” and “down” positions, this indicates that the rate-determining step is the spontaneous and simultaneous orientation of all three amino acids in the “down” position. (c) As opposed to this, if we only see amino acid 3 (blue) and, moreover, in the “up” position, it would indicate that there is a stabilizing interaction between this amino acid and the helix-loop-helix element which is not possible in the “down” position. Thus, in this case the change of amino acid 3 from “up” to “down” would be the rate-limiting step of the transition from state A to B and a potential target for drugs.

Abbildung 3. Übergang zwischen zwei funktionellen Zuständen – Fiktive Beispiele molekularer Mechanismen. Nehmen wir an, dass der Übergang von Zustand A zu Zustand B die Bewegung eines Schleifenelementes mit drei Aminosäuren (gelb, pink und blau) an einem statischen Helix-Schleife-Helix Element (grau) vorbei voraussetzt. (a) Diese Bewegung ist jedoch im Ausgangszustand (alle drei Aminosäuren „oben“) nicht möglich, da nicht genügend Platz für die Passage vorhanden ist. (b) Wenn wir im Elektronenmikroskop einen Zustand A beobachten, bei dem alle drei Aminosäuren nicht sichtbar, also in einer Überlagerung der Positionen „oben“ und „unten“ sind, deutet diese darauf hin, dass der geschwindigkeitsbestimmende Schritt die zufällige, gleichzeitige Ausrichtung aller drei Aminosäuren nach „unten“ ist. (c) Wenn wir hingegen nur Aminosäure 3 (blau) sehen, und zwar in der „oben“ Position, würde das darauf hindeuten, dass es eine stabilisierende Interaktion zwischen dieser Aminosäure und dem Helix-Schleife-Helix Element gibt, welche in der „unten“ Position nicht möglich ist. Der Wechsel von Aminosäure 3 „oben“ zu „unten“ wäre also in diesem Fall der limitierende Schritt des Übergangs von Zustand A zu B., und ein potentielles Ziel für Medikamente.

for example, that a particular amino acid limits the transition. (Figure 3).

Based on these insights, it may be possible to develop drugs in future that intervene more subtly in the activity of a protein than currently available substances. Drugs are currently developed on the basis of a few static structures of a protein. Although these structures provide important information about the composition and form of functional areas in and on the protein, active substances developed in this way are mostly intended to completely block or activate the functional areas. Hence, these drugs switch the target protein either on or off

wir Zustände vergleichen, welche aus ein und derselben Probe und Messung stammen, können wir ausschließen, dass beobachtete Unterschiede durch unterschiedliche Probenvorbereitung verursacht wurden. Weiterhin ist es bei unserer Strategie nicht notwendig, einzelne funktionelle Zustände mittels biochemischer oder genetischer Manipulation zu stabilisieren und zu isolieren. Daher können wir unerwünschte Nebeneffekte solcher Manipulationen vermeiden. Aus diesen beiden Gründen sind wir in der Lage, auch subtile Unterschiede zwischen Konformationen einzelner Aminosäuren zu erkennen und zu interpretieren. Erkennbar wurde so zum Beispiel die lokale

completely. As mentioned at the outset, the effect on the patient can only be controlled through the dosage administered. However, if we understand the dynamic behavior of a protein we can develop active substances – without directly targeting active centers – which calibrate the dynamic equilibrium between states and in this way trigger the exact effect that a drug should have.

Abwesenheit oder Unsichtbarkeit einzelner Aminosäuren in einem funktionellen Zustand. Dieses ermöglicht es uns, den mechanistischen Beitrag dieser Komponenten abzuschätzen, und so zum Beispiel herauszufinden, dass eine bestimmte Aminosäure den Übergang limitiert. (Abbildung 3).

Ausgehend von diesen Erkenntnissen könnte es in Zukunft möglich sein, Medikamente zu entwickeln, welche subtiler in die Aktivität eines Proteins eingreifen als es mit derzeitigen Substanzen möglich ist. Aktuell werden Medikamente ausgehend von einigen wenigen statischen Strukturen eines Proteins entwickelt. Diese Strukturen liefern zwar wichtige Informationen über den Aufbau und die Form funktioneller Bereiche in und auf dem Protein. Auf diese Weise entwickelte Wirkstoffe sollen jedoch die funktionellen Bereiche meist vollständig blockieren oder aktivieren. Diese Medikamente schalten das Zielprotein also entweder aus oder an. Wie eingangs erwähnt, kann man die Wirkung auf den Patienten nur durch die Dosis steuern. Wenn wir jedoch das dynamische Verhalten eines Proteines verstehen, dann können wir – ohne direkt auf aktive Zentren zu zielen – Wirkstoffe entwickeln, welche das dynamische Gleichgewicht zwischen Zuständen justieren und so genau den Effekt hervorrufen, den ein Medikament haben soll.

Contact | Kontakt

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

References | Literaturhinweise

- [1] Behrmann, E., Müller, M., Penczek, P.A., Mannherz, H.G., Manstein, D.J., and Raunser, S. (2012). Structure of the rigor actin-tropomyosin-myosin complex. *Cell* 150, 327–338.
- [2] Behrmann, E., Loerke, J., Budkevich, T.V., Yamamoto, K., Schmidt, A., Penczek, P.A., Vos, M.R., Bürger, J., Mielke, T., Scheerer, P., et al. (2015). Structural snapshots of actively translating human ribosomes. *Cell* 161, 845–857.



Of drugs, transport capsules and nanomachines

Michael Famulok | Max Planck Fellow: Chemical Biology

Chemical biology uses methods from synthetic chemistry to gain insights into the molecular functioning of cells and to influence cellular functions. Another activity is the development of artificial systems involving the integration of biological and chemical-synthetic components. The structures that can be produced through chemical synthesis range from small organic molecules, known as “small molecules”, to supramolecular architectures, for example nanomachines. The Chemical Biology Research Group studies signal

Von Medikamenten, Transportkapseln und Nanomaschinen

Die Chemische Biologie nutzt Methoden der synthetischen Chemie, um Einblicke in die molekulare Funktionsweise von Zellen zu gewinnen und die zellulären Funktionen zu beeinflussen. Ein weiterer Bereich ist die Entwicklung artefizieller Systeme, die aus der Integration biologischer und chemisch-synthetischer Komponenten bestehen. Dabei reichen die Strukturen, die durch chemische Synthese hergestellt werden können, von kleinen organischen Molekülen, sogenannten *small molecules*, bis zu supramolekularen Architekturen wie z. B. Nanoma-

transduction in cells with the help of small molecules, develops supramolecular, nucleic-acid-based carrier systems for drugs, and produces nucleic-acid-based nanomachines.

Diabetes and insulin resistance

To guarantee an organism's integrity, the number of cells it comprises and their metabolism are precisely regulated. One of the most important metabolic regulators for human cells is insulin, a hormone that is released following the intake of food. Insulin binds to a specific protein on the surface of cells, for example liver cells, known as the insulin receptor. The insulin binding activates the receptor and it transmits a signal to the cell interior, which raises the cell's metabolic activity. Among other consequences, this activation leads to the absorption of sugar from the blood (Figure 1). If this signal is not sufficiently strong despite a high level of insulin in the blood, a condition known as insulin resistance arises which can result in the development of diabetes over the course of time.

We have been interested in the functioning of a particular family of proteins, the cytohesins, for a long time. As part of this work, we searched for a cytohesin inhibitor in a library comprising thousands of different small organic molecules. We were able to use the small molecule inhibitor we found to inhibit the function of the cytohesins in cells. As a result, we made the unexpected discovery that the inhibition of the cytohesins in liver cells leads to insulin resistance and, based on this, we were able to demonstrate that the cytohesins play an important role in insulin signal transduction [1]. If a cytohesin inhibitor had not been available, it is unlikely that we would have made this discovery.

Cancer and chemotherapeutic drugs

Chemotherapeutic drugs are agents that kill cells or inhibit their reproduction. For this reason, they are widely used for the treatment of cancer. However, chemotherapeutic drugs have a crucial disadvantage: they kill not only cancer cells but also healthy cells, above all rapidly-reproducing cells, for example blood cells. Thus, there is considerable

schinen. Die Arbeitsgruppe "Chemische Biologie" untersucht die Signalübertragung in Zellen mit Hilfe von small molecules, entwickelt supramolekulare, nukleinsäurebasierte Trägersysteme für Medikamente und stellt nukleinsäurebasierte Nanomaschinen her.

Diabetes und Insulinresistenz

Zahl und Stoffwechsel der Zellen eines Organismus werden genau reguliert, um die Integrität des Organismus zu gewährleisten. Einer der bedeutendsten Regulatoren der Stoffwechselaktivität menschlicher Zellen ist Insulin, ein Hormon, das nach Nahrungsaufnahme freigesetzt wird. Insulin bindet an der Zelloberfläche, z. B. von Leberzellen, an ein bestimmtes Protein, den Insulinrezeptor. Durch die Insulinbindung wird der Rezeptor aktiviert und sendet ein Signal in das Zellinnere, das die Stoffwechselaktivität der Zelle erhöht, was unter anderem zur Aufnahme von Zucker aus dem Blut führt (Abbildung 1). Ist dieses Signal nicht ausreichend stark, obwohl der Insulinspiegel im Blut hoch ist, man spricht von Insulinresistenz, kann es im Laufe der Zeit zur Entwicklung einer Diabetes-Erkrankung kommen.

Wir interessieren uns seit längerem für die Funktion einer bestimmten Proteinfamilie, der Cytohesine. Deshalb wurde eine Bibliothek tausender verschiedener kleiner organischer Moleküle nach einem Inhibitor der Cytohesine durchsucht. Der gefundene *small molecule* Inhibitor konnte dann verwendet werden, um in Zellen die Funktion der Cytohesine zu hemmen. So konnten wir unerwarteterweise feststellen, dass die Inhibition der Cytohesine in Leberzellen zur Insulinresistenz führte, und somit zeigen, dass die Cytohesine eine wichtige Rolle in der Insulin-Signalübertragung spielen [1]. Ohne die Verfügbarkeit eines Cytohesin-Inhibitors wäre uns diese Entdeckung wahrscheinlich nicht gelungen.

Krebs und Chemotherapeutika

Chemotherapeutika sind Substanzen, die Zellen abtöten oder zumindest deren Vermehrung hemmen. Deshalb werden sie erfolgreich zur

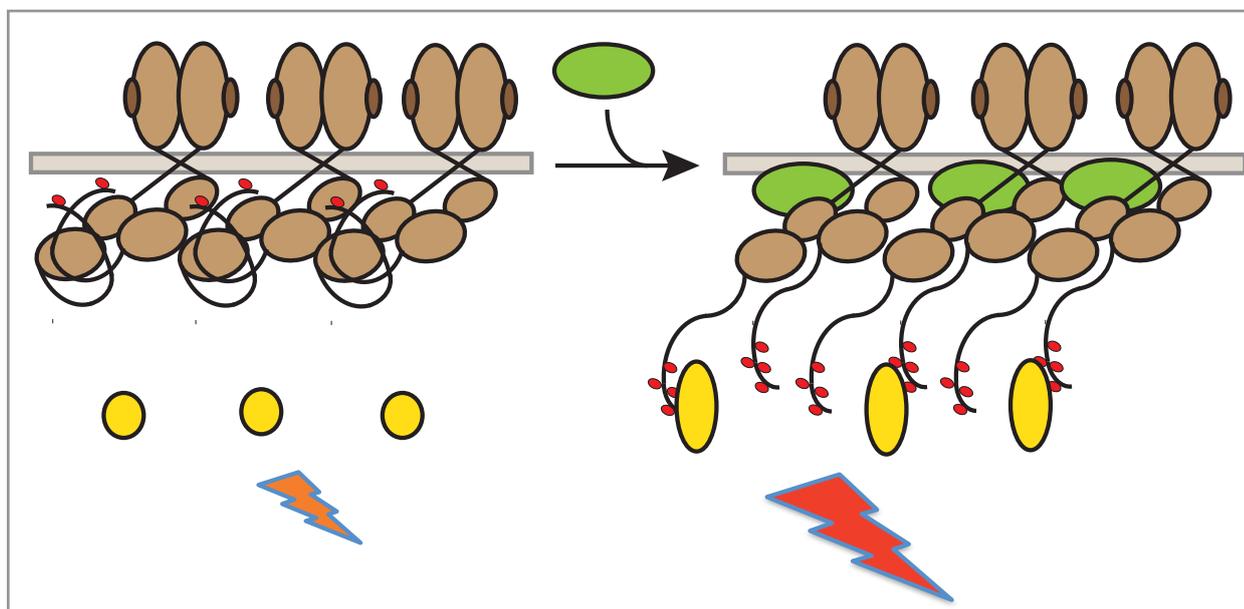


Abbildung 1. Modellvorstellung zur Wirkung von Cytohesinen an Zelloberflächenrezeptoren. Cytohesine (grün) binden an die Rezeptoren, z. B. den Insulinrezeptor, (braun) und ermöglichen dadurch die Bindung von weiteren Signalmolekülen (gelb). Diese leiten das Signal (roter Blitz) weiter ins Zellinnere.

Figure 1. Model of the effect of cytohesins on cell surface receptors. Cytohesins (green) bind to the receptors, for example the insulin receptor (brown), and thereby enable the binding of additional signaling molecules (yellow). The latter transmit the signal (red flash) to the cell interior.

interest in the development of methods that allow targeting chemotherapeutic drugs exclusively to cancer cells. Although the exclusive targeting of cancer cells is not currently possible, preferential targeting is possible because, depending on the type of cancer in question, cancer cells often overexpress a particular protein on their surface that is present in considerably smaller amounts on normal cells. If the chemotherapeutic drug is packaged in a carrier system that binds to this protein, it is preferentially transported to the cancer cells.

We developed a carrier system for the chemotherapeutic drug doxorubicin, which binds to

Krebsbehandlung eingesetzt. Der wesentliche Nachteil der Chemotherapeutika besteht darin, dass sie nicht nur Krebszellen abtöten, sondern auch gesunde Zellen, vor allem solche, die sich rasch vermehren wie z. B. Blutzellen. Daher besteht ein großes Interesse an Methoden, die es erlauben, Chemotherapeutika zielgerichtet zu Krebszellen zu steuern und nur dort freizusetzen. Auch wenn das ausschließliche Ansteuern von Krebszellen derzeit nicht möglich ist, ist das präferenzielle Ansteuern durchaus möglich, weil Krebszellen oft ein, je nach Krebsart unterschiedliches Protein an der Zelloberfläche in hoher Zahl besitzen, das auf normalen Zellen in deutlich geringerem Ausmaß vorhanden ist. Wird das Chemotherapeutikum nun in ein Trägersystem verpackt, das an dieses Protein bindet, wird es bevorzugt zu den Krebszellen transportiert.

Wir haben ein Trägersystem für das Chemotherapeutikum Doxorubicin entwickelt, das an das Zelloberflächenprotein "Met" bindet, das einige Krebszellen in deutlich erhöhter Zahl tragen. Das Trägersystem besteht aus zwei verschiedenen Nucleinsäuren, von denen eine an "Met" bindet und die andere das Doxorubicin einschließt. Die beiden Nucleinsäuren wurden aus einem nahezu unbegrenzt großen Pool synthetisch erzeugter unterschiedlicher Nucleinsäuren durch ein

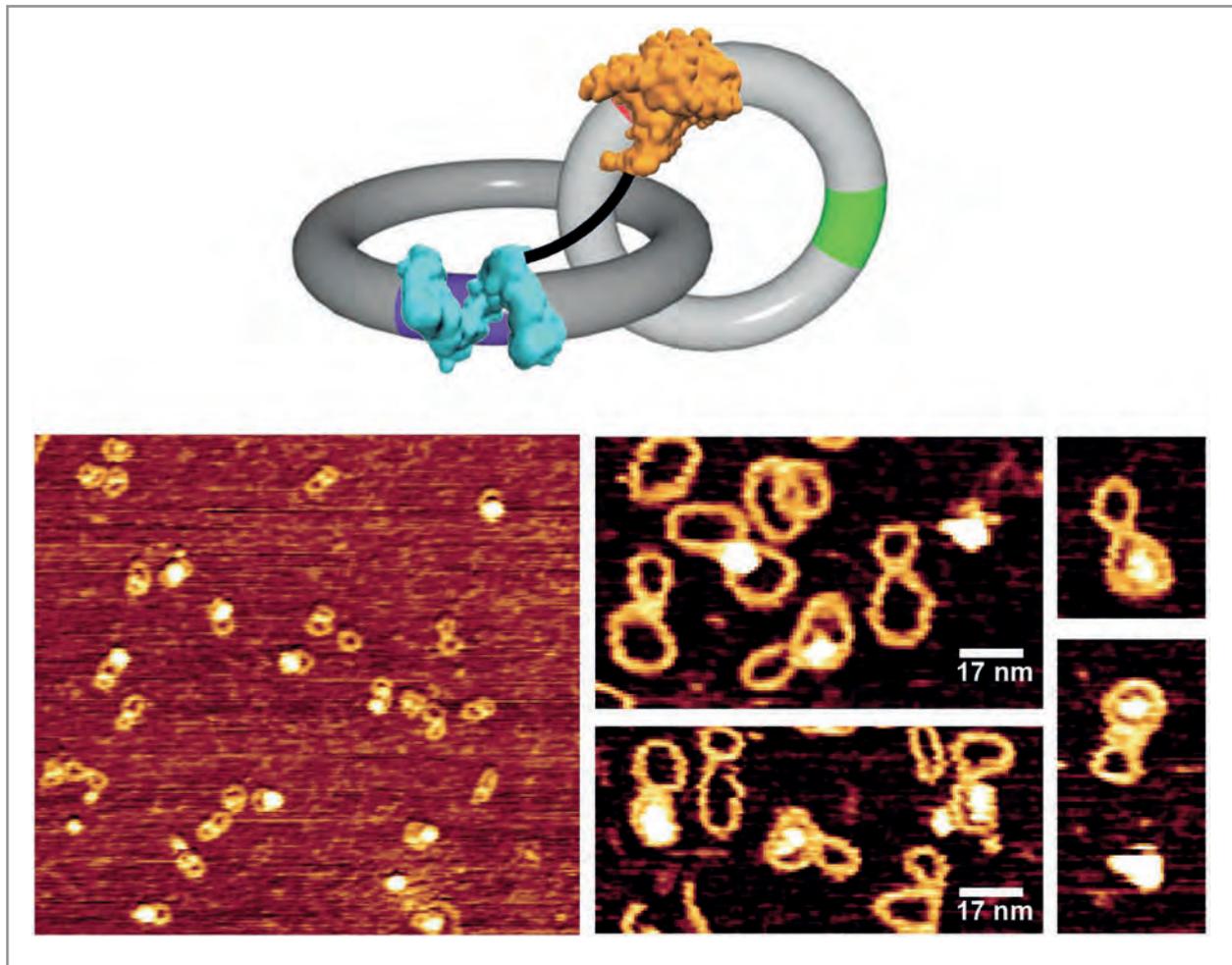


Abbildung 2. Aufbau des DNA-Catenan Rotationsmotors. Oben: Schematische Darstellung der an das DNA-Catenan gebundenen Polymerase. Unten links: Atomkraftmikroskopische (AFM) Aufnahme der oben gezeigten Bio-hybrid-Struktur auf einer Mica-Oberfläche. Unten rechts: Hochaufgelöste-AFM Bilder des DNA-Catenan/Polymerase-Motor-Komplexes in Flüssigkeit. Die hellen Bereiche entsprechen der Polymerase, die aufgrund ihrer größeren Ausdehnung in der vertikalen Achse heller dargestellt wird.

Figure 2. Structure of the DNA catenane rotary motor. Above: Schematic representation of the polymerase interlocked with the DNA catenane. Below left: Atomic force microscopy (AFM) image of the above illustrated bio-hybrid structure on a mica surface. Below right: High-resolution AFM images of the DNA catenane/polymerase motor complex in liquid. The light-colored areas correspond to the polymerase which appears brighter due to its higher profile on the surface.

the cMet cell surface protein; considerably elevated amounts of these proteins are found on cancer cells. The carrier system consists of two different nucleic acids, of which one binds to a cMet protein, whereas the other one includes the doxorubicin. The two nucleic acids were obtained from an almost unlimited pool of different, synthetically generated nucleic acids using a special selection process called

besonderes Selektionsverfahren, SELEX genannt, gewonnen. Dann wurden die Nukleinsäuren so verändert, dass sie durch Selbstorganisation ein Partikel bilden, das beide Nukleinsäuren und das eingeschlossene Doxorubicin enthält. Zusätzlich wurde die Nukleinsäure, die das Doxorubicin einschließt, so modifiziert, dass sie das Doxorubicin nach Bestrahlung mit UV-Licht freisetzt. Mit diesem

SELEX. The nucleic acids were then modified so that they form a particle through self-organization that contains both nucleic acids and the enclosed doxorubicin bound to its nucleic acid sequence. The nucleic acid that binds the doxorubicin was modified in such a way that it released the doxorubicin following irradiation with UV light. With this carrier system, we succeeded in infiltrating the doxorubicin very efficiently into cultured cancer cells. Whether it will be possible to develop this promising approach into a therapeutically viable carrier system for chemotherapeutic drugs will be further investigated in future studies.

DNA and nanomachines

Another of our research interests concerns the development of nanomachines based on ring-shaped DNA nanoarchitectures, which are interlocked by mechanical binding. The interlocking of the ring-shaped molecules ensures that they cannot come apart but that their individual components can move freely with respect to each other like the links in a chain [2-4].

Examples of such molecules include catenanes and rotaxanes. Our aim is to modify these interlocked DNA molecules in such a way that a unidirectional rotation of one of the interlocked ring molecules occurs, driven by the consumption of chemical energy. This kind of DNA nanostructure would have the function of a nanometer-sized rotational motor (Figure 2). The "flywheel" is driven by a polymerase, which uses nucleoside triphosphates (NTPs) as fuel. The RNA arises as a waste product; however, we are able to use it to make the nanomotor run along a predefined path on a DNA origami structure. Thus DNA nanostructures of this kind can be used as model systems for transport molecules as they are used within cells for the transportation of different "cargos" which are usually packaged in vesicles. Our aim is to design and produce DNA nanomachines with highly complex functions that self-organize and can fulfill intricate tasks.

Trägersystem ist es uns zumindest in einem Zellkultur-Modellsystem gelungen, das Doxorubicin hocheffizient in Lungenkrebszellen einzuschleusen. Ob sich aus diesem vielversprechenden Ansatz ein therapeutisch anwendbares Trägersystem für Chemotherapeutika entwickeln lässt, kann allerdings zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht beurteilt werden.

DNA und Nanomaschinen

Ein weiterer Bereich unserer Forschungsinteressen beinhaltet die Entwicklung von Nanomaschinen auf der Basis von ringförmigen DNA-Nanoarchitekturen, die mittels der sogenannten „mechanischen Bindung“ miteinander verknüpft sind. Dabei handelt es sich um ringförmige Moleküle, deren Einzelkomponenten so miteinander verzahnt sind, dass sie nicht auseinander fallen können, deren einzelne Komponenten aber gegeneinander dennoch frei beweglich sind, ähnlich wie die Glieder einer Kette [2-4].

Beispiele für solche Moleküle sind Catenane oder Rotaxane. Unser Ziel ist es, diese miteinander verzahnten DNA-Moleküle so zu modifizieren, dass unter Verbrauch chemischer Energie eine unidirektionale Rotationsbewegung eines der verzahnten Ringmoleküle erzeugt wird. Eine solche DNA-Nanostruktur hätte die Funktion eines Rotationsmotors von Nanometergröße (Abbildung 2). Der Antrieb des „Schwungrades“ erfolgt durch eine Polymerase, die Nucleosidtriphosphate (NTPs) als Treibstoff verbraucht. Dabei entsteht RNA als Abfallprodukt, die wir jedoch nutzen können, um den Nanomotor gezielt entlang einer auf einer DNA-Origamistruktur vorgegebenen Wegstrecke entlanglaufen zu lassen. DNA-Nanostrukturen dieser Art dienen daher als Modellsysteme von Transportmolekülen, wie sie innerhalb von Zellen zum Transport von verschiedenen, meist in Vesikel verpackten „Gütern“ genutzt werden. Unser Ziel ist es, DNA-Nanomaschinen mit hochkomplexen Funktionen zu designen und herzustellen, die sich selbst organisieren und komplexe Aufgaben erfüllen können.

Contact | Kontakt

Prof. Dr. Michael Famulok
Max Planck Fellow
Chemical Biology
Phone +49 (0)228 9656-401
m.famulok@uni-bonn.de

References | Literaturhinweise

- [1] Hafner, M., Schmitz, A., Grune, I., Srivatsan, S. G., Paul, B., Kolanus, W., Quast, T., Kremmer, E., Bauer, I. and Famulok, M. (2006) Inhibition of cytohesins by SecinH3 leads to hepatic insulin resistance. *Nature* 444, 941-944.
- [2] Weigandt, J., Chung, C.-L., Jester, S.-S. and Famulok, M. (2016) Daisy Chain Rotaxanes Made from Interlocked DNA Nanostructures. *Angewandte Chemie International Edition* 55, 5512-5516.
- [3] Valero, J., Lohmann, F., Keppner, D. and Famulok, M. (2016) Single-Stranded Tile Stoppers for Interlocked DNA Architectures. *ChemBioChem* 17, 1146-1149.
- [4] Li, T., Lohmann, F. and Famulok, M. (2014) Interlocked DNA nanostructures controlled by a reversible logic circuit. 5, 4940.

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

The International Max Planck Research School (IMPRS) for Brain and Behavior completed its first full year of operation in 2016. This graduate school is the first transatlantic cooperation in this field between two Max Planck-run neuroscience institutes (caesar and the Max Planck Florida Institute of Neuroscience) and two universities (the University of Bonn and Florida Atlantic University). The office for the school, run by program coordinator Denise Butler, is located at caesar. Despite it being its first year, the program attracted 200 applicants, 25 of whom were invited to a two-day selection symposium held at caesar in March 2016. Of these, 17 students were accepted into the program.

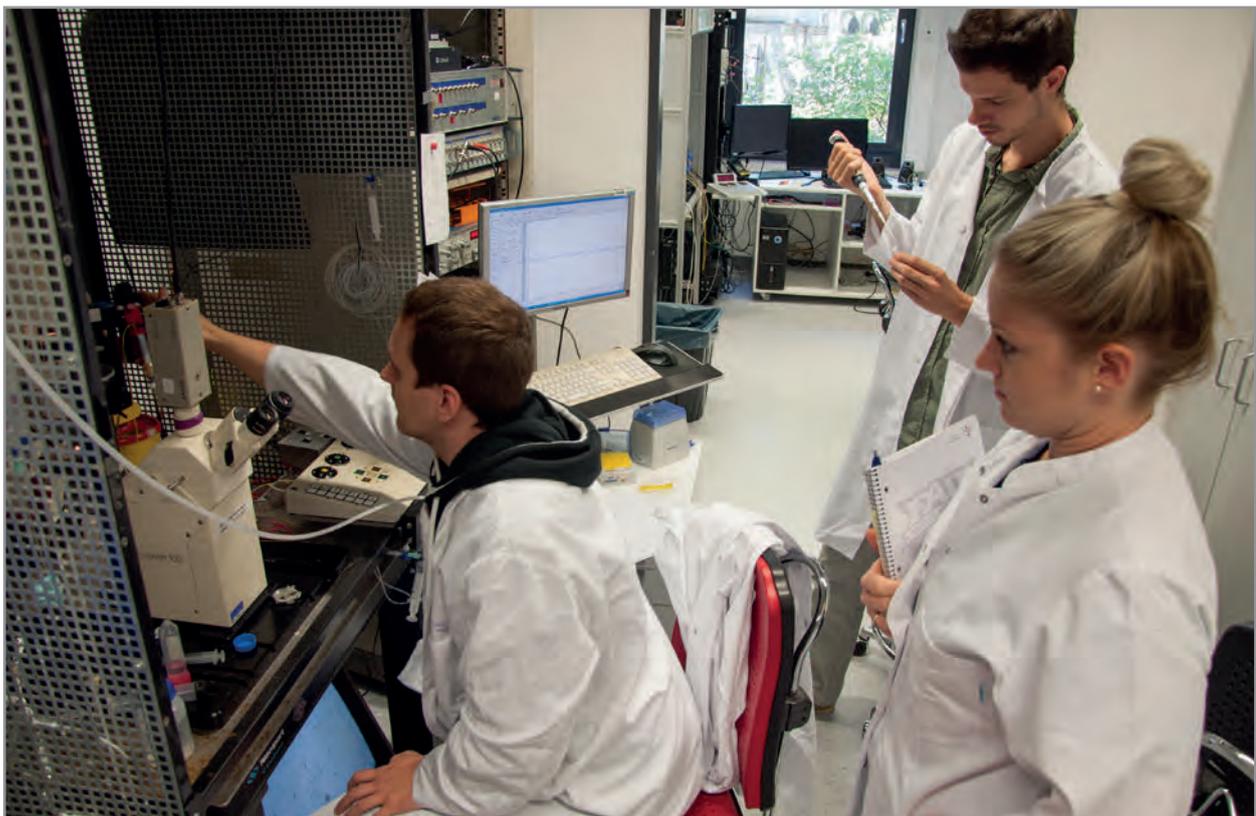
The graduate school has 40 faculty members and addresses a central question in biology: how do brains of animals encode information from the outside world, and how is this translated into an interaction with the environment? New technologies allow unprecedented access to neurons within the brain of awake animals and therefore the purpose of the IMPRS program is to provide students with both theoretical and hands-on training in these advanced neuroscience techniques. In addition to the ongoing course work, the students attend a structured intense two-week course combining lectures and hands-on lab experience in the latest techniques of *in vivo* electrophysiology, *in vivo* microscopy, and optic fabrication. For the IMPRS inaugural class, this course was held at caesar from August 29 through September 10, 2016. Expert lecturers were sourced from around the world to ensure that the students are exposed to the latest advances in imaging and electrophysiology. Time was also available for the international faculty to interact with students in a relaxed atmosphere outside of the classroom.



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

Für die International Max Planck Research School (IMPRS) for Brain and Behavior war 2016 das erste vollständige Arbeitsjahr. Dieses erste transatlantische Graduiertenprogramm im Rahmen der Doktorandenförderung der Max-Planck-Gesellschaft ist eine Kooperation zwischen zwei neurowissenschaftlichen Instituten (caesar und das Max Planck Florida Institute of Neuroscience) und zwei Universitäten (die Universität Bonn und die Florida Atlantic University). Das Koordinationsbüro ist bei caesar ansässig und wird von Denise Butler betreut. Bereits im ersten Jahr konnte das Programm 200 Bewerber verzeichnen, von denen 25 zu einem zweitägigen Auswahl-symposium im März 2016 bei caesar eingeladen wurden. 17 Studierende wurden schließlich zur IMPRS zugelassen.

Der IMPRS-Fakultät gehören 40 Mitglieder an. Inhaltlich geht es um eine Kernfrage der Biologie: Wie wird von der Außenwelt aufgenommene Information im Tiergehirn kodiert und wie erfolgt daraus eine Interaktion mit der Umwelt? Moderne neurowissenschaftliche Verfahren ermöglichen auf noch nie dagewesene Weise den Zugang zu Neuronen im Gehirn wacher Tiere. Das IMPRS-Programm will theoretische und praktische Kenntnisse in diesen Verfahren vermitteln. Neben den laufenden Lehrveranstaltungen absolvieren die Studierenden einen zweiwöchigen Intensivkurs, der Vorlesungen mit praktischer Laborarbeit unter Einsatz modernster *in vivo* Elektrophysiologie-, Mikroskopie- und optischer Techniken kombiniert. Für den ersten IMPRS-Jahrgang fand dieser Kurs vom 29. August bis 10. September 2016 bei caesar statt. Er wurde von einer Gruppe international anerkannter Neurowissenschaftler durchgeführt, mit denen sich die Studierenden auch außerhalb der Kurszeiten in ungezwungener Atmosphäre austauschen konnten.



Publications
Publikationen

Akoury, E., Mukrasch, M.D., Biernat, J., Tepper, K., Ozenne, V., Mandelkow, E., Blackledge, M. & Zweckstetter, M. (2016) „Remodeling of the conformational ensemble of the repeat domain of tau by an aggregation enhancer“ *Protein Sci.* 25, 1010-1020

Berger, T.K., Fußhöller, D.M., Goodwin, N., Bönigk, W., Müller, A., Khesroshahi, N.D., Brenker, C., Wachten, D., Krause, E., Kaupp, U.B. & Strünker, T. (2016) „Posttranslational cleavage of Hv1 in human sperm tunes pH- and voltage-dependent gating“, *J. Physiol.* 595, 1533-1546

Björkgren, I., Alvarez, L., Blank, N., Balbach, M., Turunen, H., Laajala, T.D., Toivanen, J., Krutskikh, A., Wahlberg, N., Huhtaniemi, I., Poutanen, M., Wachten, D. & Sipilä, P. (2016) „Targeted inactivation of the mouse epididymal beta-defensin 41 alters sperm flagellar beat pattern and zona pellucida binding“ *Mol. Cell. Endocrinol.* 427, 143-154

Dennissen, F.J.A., Anglada-Huguet, M., Sydow, A., Mandelkow, E. & Mandelkow, E.M. (2016) „Adenosine A1 receptor antagonist rolofylline alleviates axonopathy caused by human Tau Δ K280“ *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 113, 11597-11602

Greifenberg, A.K., Höning, D., Pilarova, K., Düster, R., Bartholomeeusen, K., Böskén, C., Anand, K., Blazek, D., & Geyer, M. (2016). „Structural and functional analysis of the Cdk13/cyclin K complex“ *Cell Rep.* 14, 320-331

Gorsky, M.K., Burnouf, S., Dols, J., Mandelkow, E. & Partridge, L. (2016) „Acetylation mimic of lysine 280 exacerbates human Tau neurotoxicity *in vivo*“ *Sci. Rep.* 6, 22685

Hagelueken, G., Hoffmann, J., Schubert, E., Duthie, F.G., Florin, N., Konrad, L., Imhof, D., Behrmann, E., Morgner, N. & Schiemann, O. (2016) „Studies on the X-Ray and solution structure of FeoB from *Escherichia coli* BL21“ *Biophys. J.* 110, 2642- 2650

Holtzman, D.M., Carrillo, M.C., Hendrix, J.A., Bain, L.J., Catafau, A.M., Gault, L.M., Goedert, M., Mandelkow, E., Mandelkow, E.M., Miller, D.S., Ostrowitzki, S., Polydoro, M., Smith, S., Wittmann, M. & Hutton, M. (2016) „Tau: From research to clinical development“ *Alzheimers Dement.* 12, 1033-1039

Kaupp, U.B. & Alvarez, L. (2016) „Sperm as microswimmers – navigation and sensing at the physical limit“ *Eur. Phys. J. Spec. Top.* 225, 2119-2139

Kerzhner, M., Abdullin, D., Wiecek, J., Matsuoka, H., Hagelueken, G., Schiermann, O. & Famulok, M. (2016) „Post-synthetic Spin-Labeling of RNA through Click Chemistry for PELDOR Measurements“ *Chem. – Eur. J. Chem. Eur. J.* 22, 12113-12121

Klionsky, D.J., Abdelmohsen, K., Abe, A., Abedin, M.J., Mandelkow, E.M. & and others (2016) „Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition)“ *Autophagy* 12, 1-222

Krüger, L. & Mandelkow, E.M. (2016) „Tau neurotoxicity and rescue in animal models of human Tauopathies“ *Curr. Opin. Neurobiol.* 36, 52-58

Landau, I.D., Egger, R., Dercksen, V.J., Oberlaender, M. & Sompolinsky, H. (2016) „The impact of structural heterogeneity on excitation-inhibition balance in cortical networks“ *Neuron* 92, 1106-1121

Lawatscheck, C., Pickhardt, M., Wieczorek, S., Grafmuller, A., Mandelkow, E. & Borner, H.G. (2016) „Generalizing the Concept of Specific Compound Formulation Additives towards Non-Fluorescent Drugs: A Solubilization Study on Potential Anti-Alzheimer-Active Small-Molecule Compounds“ *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 55, 8752-8756

Mair, W., Muntel, J., Tepper, K., Tang, S., Biernat, J., Seeley, W.W., Kosik, K.S., Mandelkow, E., Steen, H. & Steen, J.A. (2016) „FLEXITau: Quantifying Post-translational Modifications of Tau Protein *in Vitro* and in Human Disease“ *Anal. Chem.* 88, 3704-3714

Mukherjee, S., Jansen, V., Jikeli, J., 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* 5, e14052

Nonnenmacher, M., Behrens, C., Berens, P., Bethge, M. & Macke, J.H. (2016) „Signatures of criticality arise in simple neural population models with correlations“ *Arxiv preprint*, 1603.00097

Park, M., Bohner, G. & Macke, J.H. (2016) „Unlocking neural population non-stationarities using hierarchical dynamics models“ *Adv. Neural Inf. Process. Sys. (NIPS2015)* 28, 5790

Pir, G.J., Choudhary, B., Mandelkow, E. & Mandelkow, E.M. (2016) „Tau mutant A152T, a risk factor for FTD/PSP, induces neuronal dysfunction and reduced lifespan independently of aggregation in a *C. elegans* Tauopathy model“ *Mol. Neurodegener.* 11, 33

Schneider, S., Balbach, M., Jikeli, J., Fietz, D., Nettersheim, D., Jostes, S., Schmidt, R., Kresin, M., Bergmann, M., Wachten, D., Steger, K., & Schorle, H. (2016) „Re-visiting the Prothamine-2 locus: deletion, but not haploinsufficiency, renders male mice infertile“ *Sci. Rep.* 6, 36764

Schütt, H.H., Harmeling, S., Macke, J.H. & Wichmann, F.A. (2016) „Painfree and accurate Bayesian estimation of psychometric functions for (potentially) overdispersed data“ *Vision Res.* 122, 105-123

Schumacher, C.H., Körschen, H.G., Nicol, C., Gasser, C., Seifert, R., Schwärzel, M. & Möglich, A. (2016) „A Fluorometric Activity Assay for Light-Regulated Cyclic-Nucleotide-Monophosphate Actuators“ *Methods Mol. Biol.* 1408, 93-105

Sydow, A., Hochgrafe, K., Konen, S., Cadinu, D., Matenia, D., Petrova, O., Joseph, M., Denissen, F.J. & Mandelkow, E.M. (2016) „Age-dependent neuroinflammation and cognitive decline in a novel Ala152Thr-Tau transgenic mouse model of PSP and AD“ *Acta Neuropathol. Commun.* 4, 17



Tschentscher, J., Hochheim, S., Brüning, H., Brune, K., Voit, K.M. & Imlau, M. (2016) „Optical riblet sensor: beam parameter requirements for the probing laser source“ *Sensors* 16, 458

Valero, J., Lohmann, F., Keppner, D. & Famulok, M. (2016) „Single-Stranded Tile Stoppers for Interlocked DNA Architectures“ *ChemBioChem* 17, 1146-1149

Voß, B., Seifert, R., Kaupp, U.B. & Grubmüller, H. (2016) „A quantitative model for cAMP binding to the binding Domain of MloK1“ *Biophys. J.* 111, 1668-1678

Wallace, D.J., Fitzpatrick, D. & Kerr, J.N. (2016) „Primate thalamus: more than meets an eye“ *Curr. Biol.* 26, R60 - R61

Wallace, D.J. & Kerr, J.N. (2016) „Behavioral neuroscience: who’s afraid of the C57BL/6 mouse?“ *Curr. Biol.* 22, R1188-R1189

Wang, Y. & Mandelkow, E. (2016) „Tau in physiology and pathology“ *Nat. Rev. Neurosci.* 17, 22-35

Weigandt, J., Chung, C.-L., Jester, S. S. & Famulok, M. (2016) „Daisy Chain Rotaxanes Made from Interlocked DNA Nanostructures“ *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 55, 5512-5516

Xiang, S.Q., Biernat, J., Mandelkow, E., Becker, S. & Linser, R. (2016) „Backbone assignment for minimal protein amounts of low structural homogeneity in the absence of deuteration“ *Chem. Commun.* 52, 4002-4005

Dissertationen:

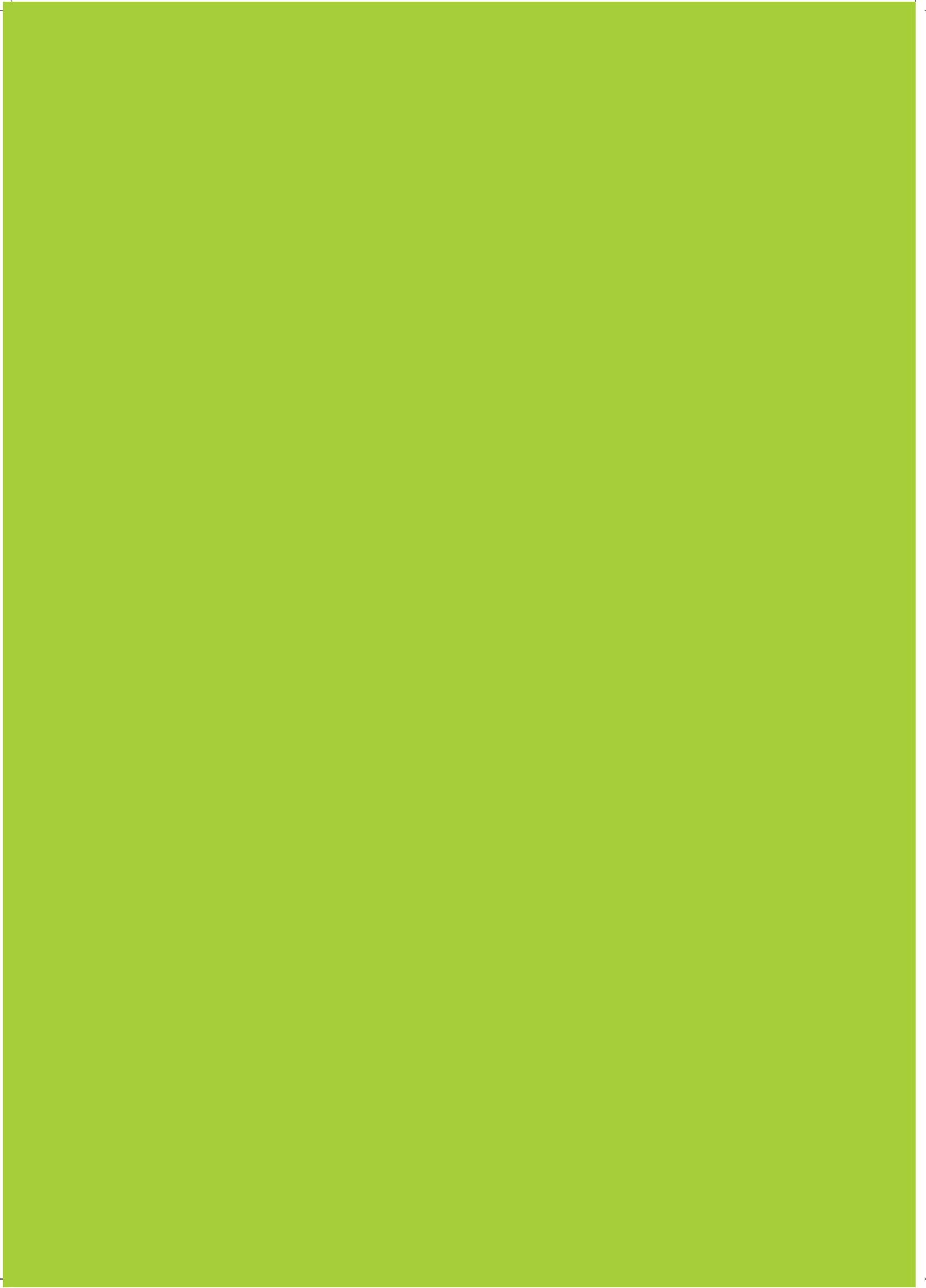
Bettio, M. (2016) „Membrane model systems to study EGFR – ARNO interaction“, Dissertation: Mathematisch- Naturwissenschaftliche Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Beckert, H. (2016) „Die Rolle von Calcium und Kalium beim klassischen Signalweg der NLRP3-Inflammasom-Aktivierung“, Dissertation: Mathematisch- Naturwissenschaftliche Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Schiffer, C. (2016) „Wirkung von Umweltchemikalien und Progesteron auf menschliche Spermien“, Dissertation: Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln

Schonauer, S. (2016) „Investigating the GBA1-dependent regulation of GBA2 activity in Gaucher disease“, Dissertation: Mathematisch- Naturwissenschaftliche Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Wobig, L. (2016) „HCN1: a hyperpolarizatin-activated, highly-selective proton channel in the sperm of the zebrafish *Danio rerio*“, Master Thesis: in Life and medical Sciences (M.Sc.) Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn



caesar Insight
caesar Einblick



Ms. Gertrud Bilski is Administrative Director and member of the caesar Board. She is strongly committed to the topic of reconciling work and family life.

Frau Gertrud Bilski ist kaufmännische Geschäftsführerin und Vorstandsmitglied von caesar. Sie engagiert sich stark für das Thema Vereinbarkeit von Beruf und Familie.

Career and family

Since 2011, caesar has been certified by the Hertie Foundation in the Work and Family Audit. The audit confirms a family and life-phase conscious personnel policy. In order to further optimise and maintain the compatibility of work, family and private life, re-audits are carried out every three years, all of them have been successfully completed by caesar. The audits define objectives in order to support caesar employees at all stages of their lives

Beruf und Familie

Seit 2011 ist caesar durch die Hertie-Stiftung im Audit berufundfamilie zertifiziert. Das Audit bestätigt eine familien- und lebensphasenbewusste Personalpolitik. Um die Vereinbarkeit von Beruf, Familie und Privatleben weiter zu optimieren und zu verstetigen, erfolgen alle drei Jahre Reauditierungen, die caesar alle erfolgreich absolviert hat. In den Audits werden Zielvorgaben definiert, die caesar-Mitarbeiter in allen Lebensphasen unterstützen sollen – von



Since 2011, the company's own day care center "caesarinis" has been available for children aged 4 months and over. Seit 2011 gibt es für Kinder ab 4 Monate die betriebseigene Tagespflegestelle caesarinis.

– from childcare solutions for children, relatives in need of care, to crisis counselling and health prevention measures. This is also implemented by an extensive range of services offered by the pme family service, which are offered to employees. The pme family service offers counselling and events in a variety of thematic areas such as health/stress, homecare/eldercare, and emergency childcare.

In addition, employees can use the company's own day care centre („caesarinis“) for their children aged between 4 months and 3 years. The care takes place in the institute's own apartment in the immediate vicinity of the research centre. A total of five care places are currently available. It is planned to increase the number of care places to nine. In addition, caesar has a parent-child office, which is available in the event of care bottlenecks.

Betreuungslösungen für Kinder und pflegebedürftige Angehörige bis zu Krisenberatungen und Maßnahmen zur Gesundheitsprävention. Umgesetzt werden diese auch durch ein umfangreiches Angebot an Serviceleistungen des pme Familienservices, die den Mitarbeitern angeboten werden. Der pme Familienservice bietet Beratung und Veranstaltungen aus unterschiedlichen Themenbereichen wie zum Beispiel Gesundheit/Stress, Homecare/Eldercare und Notfall-Kinderbetreuung an.

Darüber hinaus können die Mitarbeiter die betriebseigene Tagespflegestelle („caesarinis“) für ihre Kinder im Alter von 4 Monaten bis 3 Jahren in Anspruch nehmen. Die Betreuung erfolgt in einer institutseigenen Wohnung in direkter Nachbarschaft zum Forschungszentrum. Insgesamt stehen zurzeit fünf Betreuungsplätze zur Verfügung. Es ist geplant, die Anzahl der Betreuungsplätze auf neun zu erhöhen.



*Participants of the company run in September 2016
Teilnehmer am Firmenlauf Bonn im September 2016*

The topic of family- and life-stage-conscious leadership is firmly anchored in the annual management training courses in order to sensitize managers. For external communication on the compatibility of work and family life, the caesar-produced film „caesar – a family-friendly company“ has been available on YouTube and on the caesar homepage since February 2016.

Caesar's health management covers a wide range of services, such as: an annual health day, mobile massage at the workplace, yoga classes in the building, consultation hours with the company doctor, flu vaccination, and a pharmacy service. In September, caesar once again supported the participation in the company run in Bonn, which was attended by all sport enthusiastic employees.

hen. Zudem gibt es bei caesar ein Eltern-Kind-Büro, das bei Betreuungsengpässen zur Verfügung steht.

Unterstützend ist das Thema familien- und lebensphasenbewusstes Führen in den jährlichen Führungskräfte-schulungen fest verankert, um die Führungskräfte zu sensibilisieren. Für die externe Kommunikation zum Thema Vereinbarkeit von Beruf und Familie ist der von caesar produzierte Film „caesar – ein familienbewusstes Unternehmen“ seit Februar 2016 auf YouTube und auf der caesar-Homepage zu finden.

Das caesar-Gesundheitsmanagement umfasst eine Vielzahl von Angeboten, wie zum Beispiel: Einen jährlichen Gesundheitstag, die mobile Massage am Arbeitsplatz, Yogakurse im Haus, Sprechstunden der Betriebsärztin im Haus, Gripeschutzimpfung



und einen Apothekenservice. Im September hat caesar erneut die Teilnahme am Firmenlauf Bonn unterstützt, bei dem alle sportbegeisterten Mitarbeiter teilnahmen.

Events / Veranstaltungen

caesarium

In 2016, the research center successfully continued the lectures series "caesarium". The event is aimed at the interested public and covers a wide range of scientific topics. The speakers present their research areas in an understandable scientific form for the general public and give an idea of how exciting science can be. The topics are generally chosen in such a way that they have a current reference or a social relevance. Thus, the lectures series contributes to public discussion. The following high-ranking scientists have presented their science in the frame of a "caesarium" talk.

Auch 2016 hat das Forschungszentrum die Vortragsreihe der *caesarien* erfolgreich fortgesetzt. Die Veranstaltung wendet sich an die interessierte Öffentlichkeit und deckt ein breites Spektrum wissenschaftlicher Themen ab. Die Referenten stellen ihre Forschungsbereiche in populärwissenschaftlicher Form dar und vermitteln so einen Eindruck davon, wie spannend Wissenschaft sein kann. Die Themen sind in der Regel so gewählt, dass sie einen aktuellen Bezug oder eine gesellschaftliche Relevanz haben. Somit leistet die Vortragsreihe einen Beitrag zur öffentlichen Diskussion. Folgende hochrangige Wissenschaftler haben im Rahmen der *caesarien* über ihre Forschung berichtet:

Prof. Dr. Wolfram Schultz

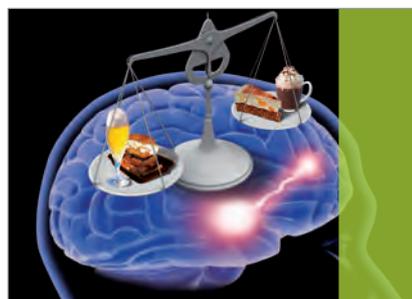
University of Cambridge, UK

„Rewarding and predicting. How the brain makes economic decisions.“

„Belohnen und Voraussagen

– wie das Gehirn ökonomische Entscheidungen trifft“

21.01.2016



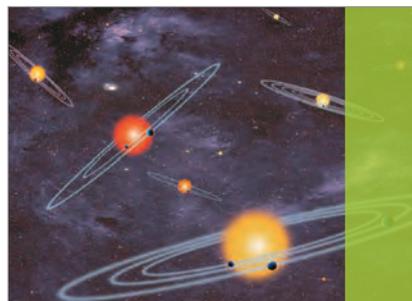
Prof. Dr. Thomas Henning

Max-Planck-Institut für Astronomie, Heidelberg

„In search of the second earth“

„Auf der Suche nach der zweiten Erde“

10.03.2016



Prof. Dr. Markus M. Nöthen

Universitätsklinikum Bonn

„Genes and delusion – deciphering the biological causes of schizophrenia“

„Gene und Wahn – die biologischen Ursachen von Schizophrenie entschlüsseln“

08.12.2016





After the slam: the organization team (left) and the slammers (right) in the caesar auditorium.

Nach dem Slam: das Organisationsteam (links) und die Slammer (rechts) im caesar Hörsaal.

Science Slam

Science meets comedy at the Science Slam: The slammers have 10 minutes time to present their research area in an understandable and pointed way. The winner is the slammer who gets the most applause from the audience. The slam, which took place in May, is organized annually by a team of students from the University of Bonn and Research Center caesar. Seats in the caesar auditorium were also very popular in 2016 and quickly sold out.

Beim Science Slam trifft Wissenschaft auf Comedy: Die Slammer haben 10 Minuten Zeit, ihr Forschungsgebiet verständlich und pointiert vorzutragen. Gewinner ist, wer am meisten Applaus von den Zuschauern bekommt. Der Slam, der im Mai stattfand, wird jährlich von einem Team aus Studierenden der Uni Bonn und dem Forschungszentrum caesar organisiert. Plätze im caesar Hörsaal waren auch 2016 sehr begehrt und schnell ausgebucht.

Further events:

Art exhibitions with the following titles:

- „Kultur meets culture“
- „By the way“
- „Stone Symposium Norway 2016“

Children's university on September 10th, 2016

Girls' Day on April 28th, 2016

Science Night on June 3rd and 4th, 2016

Weitere Veranstaltungen:

Kunsausstellungen mit den folgenden Titeln:

- „Kultur trifft culture“
- „By the way“
- „Steinsymposium Norwegen 2016“

Kinderuni am 10.09.2016

Girls' Day am 28.04.2016

Wissenschaftsnacht am 03. und 04.06.2016

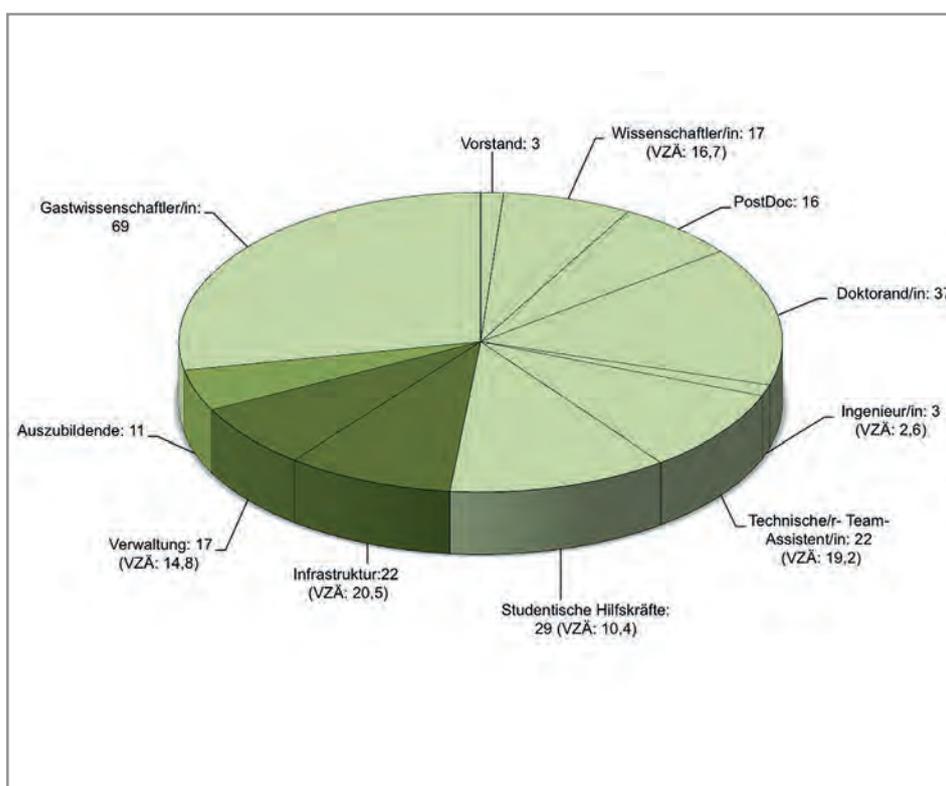
Figures and facts
Zahlen und Fakten

Personal

Personalstruktur

Am Forschungszentrum caesar waren zum 01.01.2017 insgesamt 177 Mitarbeiter/innen und 69 Gastwissenschaftler/innen beschäftigt. Die Verteilung der Beschäftigten auf die Arbeitsbereiche und Funktionen ergibt sich aus der nachfolgenden Grafik. Umgerechnet auf Vollzeitstellen sind in der Verwaltung 14,8 Personen und in der Infrastruktur 20,5 Personen beschäftigt. In der Wissenschaft und den zugeordneten wissenschaftlichen Infrastrukturbereichen arbeiten zurzeit 126 Mitarbeiter. Im Rahmen von wissenschaftlichen Kooperationen forschten zur Jahreswende 69 Gastwissenschaftler/innen am caesar. Ferner bildet caesar 11 Auszubildende in sechs Bereichen aus: Werkzeugmechaniker/in, Biologie- und Chemielaborant/in, Kaufmann/-frau für Büromanagement, Tierpfleger/in und Fachinformatiker/in.

Beschäftigte nach Funktionen, Stand 01.01.2017



Caesar konnte den Anteil weiblicher Mitarbeiter im wissenschaftlichen Bereich von 33 % auf 36 % steigern. Die Aufteilung von weiblichen und männlichen Mitarbeitern, bezogen auf die einzelnen Funktionsbereiche, ist in der unten stehenden Grafik dargestellt.

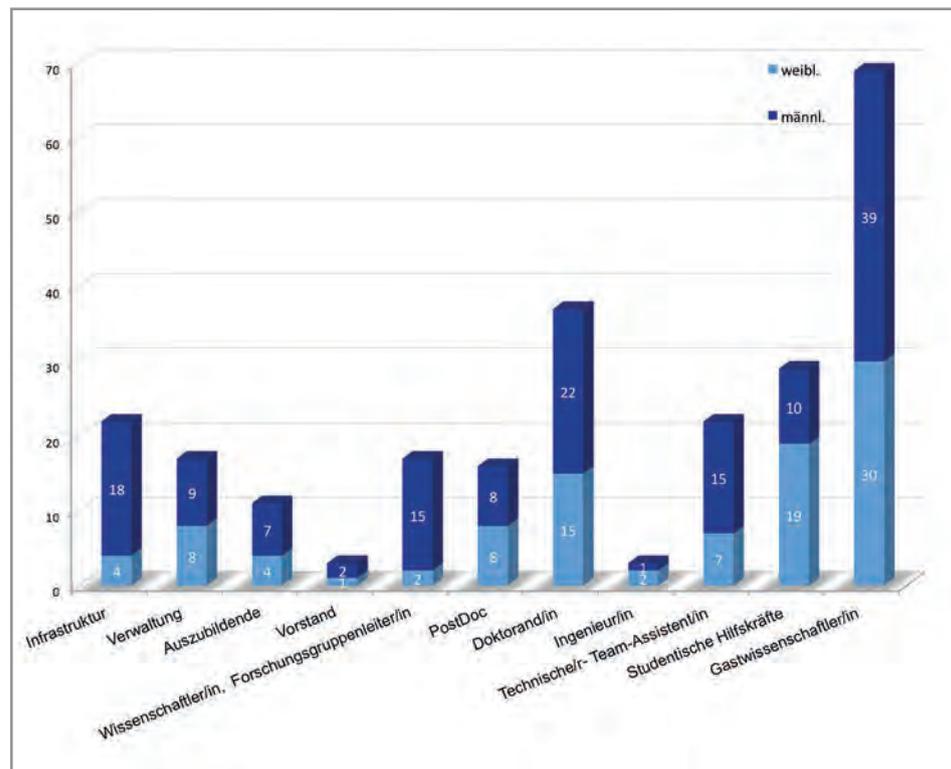


Abbildung 2: Anteil weiblicher und männlicher Mitarbeiter in den jeweiligen Funktionsbereichen

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	81.915.342 €
Finanzanlagen	301.736.604 €
Sonstige	24.608.235 €
Bilanzsumme	408.260.181 €

Erträge 2016	
Erträge aus Umsatzerlösen und Förderprojekten	4.405.420 €
Erträge aus Wertpapieren und Zinsen	13.378.533 €
Erträge insgesamt	17.783.953 €

Aufwendungen 2016	
Personalaufwand	8.060.140 €
Sachaufwand	5.143.272 €
Abschreibungen	4.081.515 €
Aufwendungen insgesamt	17.284.927 €

Jahresbilanz 2016

Bilanzabschluss zum 31.12.2016 (Angaben in €)

Aktiva	31.12.2016	31.12.2015
A. Anlagevermögen		
I. Immaterielle Vermögensgegenstände	229.160	211.734
II. Sachanlagen		
Grundstücke & Bauten	71.163.312	72.362.776
Andere Anlagen	10.070.155	11.739.515
Geleistete Anzahlungen & Anlagen im Bau	681.875	493.353
Summe aus II.	81.915.342	84.595.644
III. Finanzanlagen		
Beteiligungen	330.000	330.000
Wertpapiere des Anlagevermögens zur Anlage des Stiftungsvermögens	290.575.021	290.575.021
Wertpapiere des Anlagevermögens zur Gebäudewiederbeschaffung	10.831.583	10.831.583
Summe aus III.	301.736.604	301.736.604
Summe für A.	383.881.106	386.543.982
B. Umlaufvermögen		
I. Vorräte	273.946	249.589
II. Forderungen und sonstige Vermögensgegenstände		
Forderungen aus Lieferungen und Leistungen	936.514	184.040
Forderungen gegen Unternehmen, mit denen ein Beteiligungsverhältnis besteht	0	0
Sonstige Vermögensgegenstände	1.061.860	1.120.713
Summe aus II.	1.998.374	1.304.753
III. Wertpapiere	1.000.000	1.000.000
IV. Kassenbestand, Bundesbankguthaben, Guthaben bei Kreditinstituten und Schecks	20.788.813	18.666.719
Summe für B.	24.061.133	21.221.061
C. Rechnungsabgrenzungsposten	317.941	274.380
Gesamtes Vermögen	408.260.181	408.039.423

Passiva	31.12.2016	31.12.2015
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	6.507.317	6.008.289
Instandhaltungsrücklage	4.943.788	4.943.789
Summe aus II.	11.451.105	10.952.078
III. Ergebnis		
Jahresüberschuss/-fehlbetrag	0	0
Summe aus III.	0	0
Summe für A.	402.885.023	402.385.996
B. Sonderposten aus Investitionszuschüssen	3.646.087	4.085.052
C. Rückstellungen	608.030	569.369
D. Verbindlichkeiten		
Verbindlichkeiten aus Lieferungen und Leistungen	929.315	783.654
Sonstige Verbindlichkeiten	190.675	201.511
Summe für D.	1.119.990	985.165
E. Rechnungsabgrenzungsposten	1.051	13.841
Gesamtes Vermögen	408.260.181	408.039.423

Organe der Stiftung

Stiftungsrat

Zum 31.12.2016 war der Stiftungsrat wie folgt zusammengesetzt:

Vorsitzender

Prof. Dr. Martin Stratmann

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

Mitglieder

Prof. Dr. Jens Brüning

Max-Planck-Institut für Stoffwechselforschung, Köln

MinDir'in Bärbel Brumme-Bothe

Leiterin der Abteilung 6 im Bundesministerium für Bildung und Forschung, Berlin

Staatssekretär Dr. Thomas Grünewald

Ministerium für Innovation, Wissenschaft und Forschung des Landes NRW, Düsseldorf

Prof. Dr. Bill Hansson

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

Prof. Dr. Michael Hoch

Rektor der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Prof. Dr. Regine Kahmann

Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Marburg

Dr. Stefan Marcinowski

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

Prof. Dr. Wolfgang Plischke

Bayer AG, Leverkusen

Tankred Schipanski

Mitglied des Deutschen Bundestages, Berlin

Ulrich Schüller

Leiter der Abteilung 4 im Bundesministerium für Bildung und Forschung, Bonn



Prof. Dr. Ferdi Schüth

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

Karl Schultheis

Mitglied des Landtages NRW, Düsseldorf

Prof. Dr. Petra Schwille

Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried

Ashok-Alexander Sridharan

Oberbürgermeister der Bundesstadt Bonn

Prof. Dr. Heinz Wässle

Max-Planck-Institut für Hirnforschung, Frankfurt/Main

Vorstand

Zum 31.12.2016 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



Impressum

Herausgeber

Forschungszentrum caesar
Ludwig-Erhard-Allee 2
53175 Bonn

Redaktion und Konzept

Dr. Jason Kerr
Prof. Dr. U. Benjamin Kaupp
Gertrud Bilski

Layout und Druck

SP Medienservice
Verlag, Druck und Werbung
Reinhold-Sonnek-Str. 12
51147 Köln

© 2017

Forschungszentrum caesar
Ludwig-Erhard-Allee 2
53175 Bonn
Deutschland
Telefon: +49-228-9656-0
Telefax: +49-228-9656-111
E-Mail: office@caesar.de
www.caesar.de

