



Moleküle, Zellen und Netzwerke für die Verarbeitung von Geruchsreizen im Riechkolben der Maus

Thomas Kuner und Andreas T. Schaefer

Zusammenfassung

Wie Nervenzell-Netzwerke im Gehirn den Informationsfluss steuern und verarbeiten, ist weitestgehend ungeklärt. Bei der Geruchsverarbeitung in Säugetieren sind inhibitorische Verschaltungen in der ersten Verarbeitungsstufe, dem Riechkolben, die anatomisch dominierende Struktur. Mäuse mit spezifischer genetischer Veränderung der Neuronen des Riechkolbens konnten je nach Inhibitionsstärke im Verhaltensexperiment Gerüche schneller oder weniger schnell unterscheiden. Diese Ergebnisse sprechen für eine auch funktionell tragende Rolle der inhibitorischen Verschaltungen in der Geruchsverarbeitung.

Abstract

Molecules, cells and networks for sensory stimuli processing in the mouse olfactory bulb.

How sensory stimuli are processed by neural networks is a key question of neuroscience. Olfactory conditioning experiments in mice demonstrate that odour processing is fast and stimulus-dependent. Selective genetic perturbation of the inhibitory circuitry in the first relay station of olfactory processing, the olfactory bulb, altered such discrimination times, with increased inhibition accelerating and decreased inhibition slowing down odour discrimination. This illustrates that inhibition can fulfil a key role in sensory processing.

Keywords: olfaction; olfactory bulb; physiology

Vom Reiz zum Verhalten – Diskriminationsleistungen des olfaktorischen Systems

Der Geruchssinn ist für viele Tiere, insbesondere nachtaktive Tiere, eine grundlegend wichtige Sinnesmodalität. Die Fähigkeit Gerüche zu identifizieren und voneinander unterscheiden zu können ist in vielen Fällen überlebenswichtig. Der Geruchssinn dient nicht nur der Detektion potenziell giftiger oder besonders wohlschmeckender Nahrung, sondern kommt auch bei der Kommunikation oder Navigation zum Einsatz. Gemeinsam ist diesen sensorischen Leistungen, dass Gerüche miteinander verglichen und erkannt werden müssen. Welche Mechanismen verleihen dem olfaktorischen System diese Fähigkeiten? Welche anatomischen, zellulären und molekularen Bedingungen ermöglichen Geruchsunterscheidung?

Der Geruchsstimulus und seine Repräsentation im *Bulbus olfactorius* der Maus

Chemisch gesehen entstehen die meisten Gerüche aus einer Mischung von mehreren bis zu Hunderten verschiedener Geruchsstoffe. Jeder dieser monomolekularen Geruchsstoffe, wie beispielsweise Amylazetat (AA) oder Ethylbutyrat (EB), bindet mit unterschiedlicher Affinität an vielen der 1200 Geruchsstoffrezeptoren, von welchen jede Riechsinneszelle nur einen Rezeptortyp exprimiert (Mombaerts 2004). Somit aktiviert jeder Geruchsstoff eine individuelle Kombination von Riechsinneszellen jeweils mit unterschiedlicher Stärke. Das so entstandene räumlich-zeitlich organisierte Muster elektrischer Aktivität stellt die erste Repräsentation eines Geruchs im olfaktorischen System dar. Durch Ca^{2+} -Imaging an der anästhesierten Maus lassen sich diese Duftstoff-induzierten

afferenten Aktivitätsmuster mit guter räumlicher und zeitlicher Auflösung darstellen. Auch die Bildgebung mit spannungsabhängigen Farbstoffen im *Bulbus olfactorius* (2) zeigt, dass die Reinsubstanzen Amylazetat und Ethylbutyrat durch unterschiedliche Muster repräsentiert werden, wobei hier nur der räumliche Aspekt gezeigt ist (Abbildung 1). Die unterschiedlichen Muster lassen vermuten, dass die Maus Amylazetat und Ethylbutyrat mühelos voneinander unterscheiden kann.

Dies kann in Verhaltensexperimenten untersucht werden (Exkurs 1). Mäuse lernen die Unterscheidung von Geruchsstoffen in einem operanten Konditionierungstest (Abraham et al. 2004). Um die Wahrnehmung eines Geruchsstoffs effizient mit der Gabe einer Belohnung zu verbinden, benötigen die Mäuse 500 bis 1000 einzelne Geruchsstoffgaben. Dann kann eine Maus die trainierten Geruchsstoffe mit einer Zuverlässigkeit von 95% und mehr unterscheiden (Abbildung 1). Bei zwei Reinsubstanzen entspricht dies unserer intuitiven Erwartung; kann die Maus jedoch auch ähnlichere Stimuli ebenso effizient unterscheiden? Um ähnliche Stimuli künstlich zu generieren, können sogenannte ‚binäre‘ Mischungen der beiden Stoffe hergestellt werden: 60% AA und 40% EB wird als Mischung mit 40% AA und 60% EB verglichen. Durch die Annäherung der Prozentsätze (z.B. 52/48% versus 48/52%, Gesamtkonzentration jeweils 1% Geruchsstoff in Mineralöl) lassen sich sehr ähnliche Stimuli herstellen. Im Gegensatz zu den Mustern der Reinsubstanzen zeigen die binären Mischungen erwartungsgemäß sehr ähnliche Muster mit nur geringfügigen Unterschieden (Abbildung 1). Erstaunlicherweise können auch diese Stimuli mit nahezu perfekter Zuverlässigkeit von 95% und besser unterschieden werden (Exkurs 1D), wobei das Erlernen dieser Fähigkeit etwas mehr Zeit benötigt als bei der einfachen Geruchsstoffunterscheidung (Exkurs 1D). Welche anderen Parameter der Verhaltensleistung könnten beeinträchtigt sein? Hierzu haben wir eine etablierte Größe der Sinnesphysiologie bestimmt, nämlich die Zeit, die für die Unterscheidung zweier Stimuli benötigt wird (Abraham et al. 2004). Diese Reaktionszeit, hier als Diskriminationszeit bezeichnet, gibt eine direkte Auskunft über die neuronalen Verarbeitungsvorgänge, die der Diskriminationsfähigkeit zugrunde liegen (Exkurs 1). Die Bestimmung der Diskriminationszeiten für die Reinstoffe und binären Mischungen zeigt, dass einfache Duftstoffe bereits in 240 ms unterschieden werden können, wohingegen für die Mischungen etwa 100 ms mehr Zeit benötigt wird (Abbildung 1). Längere Dis-

Exkurs 1

Geruchsunterscheidungsverhalten

Für die Untersuchung der Leistungen des olfaktorischen Systems der Maus stehen eine Vielzahl von Verhaltenstests zur Verfügung. Die Darstellung sei hier auf das go/no-go Paradigma eines operanten Konditionierungstests beschränkt.

1. Aufbau des Verhaltenstests

Über ein Olfaktometer können mit elektrisch steuerbaren Magnetventilen Geruchspulse definierter Dauer und Konzentration (1% Geruchsstoff in Mineralöl; blau und rot) erzeugt werden. Dazu nimmt ein Luftstrom mit definierter Fließgeschwindigkeit die gesättigte Geruchsstoffatmosphäre über dem Mineralöl auf, mischt sich mit dem Trägerluftstrom und tritt dann in den Riechzylinder (grün) ein. Dort befindet sich ein Metallröhrchen, über welches Wasser als Belohnung gegeben werden kann (blau). Der Riechzylinder ist mit der Versuchskammer über eine Öffnung verbunden, welche durch eine Lichtschranke kontrolliert wird (Glühbirne und Augensymbol). Wenn die Maus durch Lecken am Metallröhrchen ihre Belohnung erhält, kann dies durch einen Stromfluss zwischen dem Metallboden der Kammer und dem Röhrchen gemessen werden. Die Steuerung dieser Vorgänge und die Messwerterfassung (Lichtschranke, Lecken) werden durch einen PC mit einer entsprechenden Software automatisch durchgeführt.

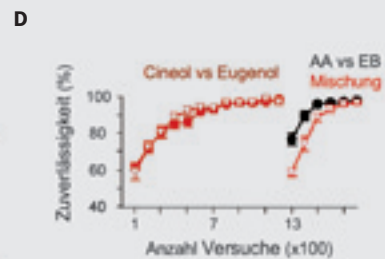
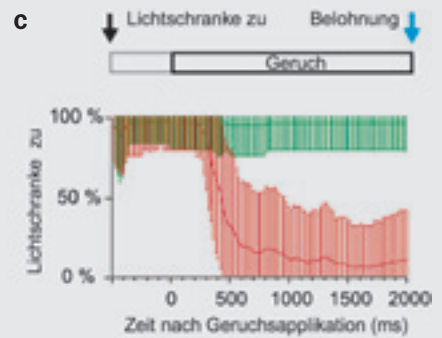
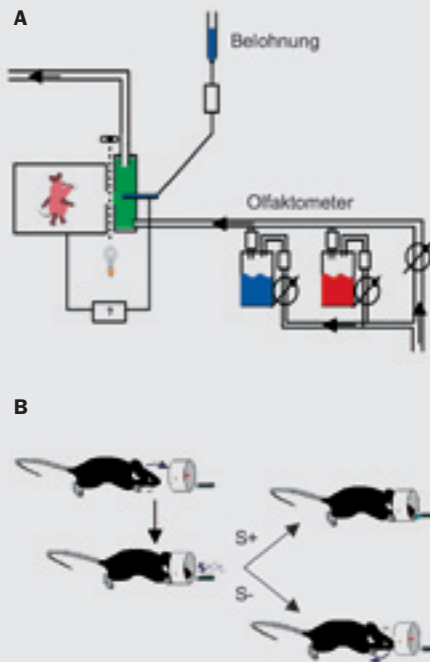
2. Ablauf eines Verhaltensexperimentes

Die Mäuse werden unter Wasserrestriktion gehalten und beziehen ihr Wasser überwiegend als Belohnung während der Verhaltenstests und einer Periode freier Wasserverfügbarkeit 12 h vor Beginn der Versuche. Die Mäuse lernen zunächst die Apparatur kennen und finden durch aktives Erkunden schnell den Ort der Wasserbelohnung. Dann lernen die Mäuse die Paarung von Belohnung und Geruchsstoff. Danach schließen sich die Sitzungen des eigentlichen Experiments an (100-200 Versuche pro Tag). Das Durchbrechen der Lichtschranke (Exkurs 1B, rot) führt nach einer kurzen Verzögerung zur Applikation eines

Geruchsstoffs (blaue wellige Pfeile), bis dann die Wassergabe (blauer Tropfen) über ein Ventil freigegeben wird (zeitlicher Ablauf siehe Exkurs 1C). Handelt es sich um den belohnten Geruchsstoff (S+), wird die Maus mit dem Kopf im Riechzylinder auf die Belohnung warten (Lichtschranke unterbrochen), bei einem nicht belohnten Geruchsstoff (S-) wird sie stereotyp ihren Kopf aus dem Riechzylinder herausziehen (Lichtschranke geschlossen, rechts unten in Exkurs 1B). Nach einem Intervall von

ermitteln, zu welchem Zeitpunkt sich die S+ und S- Kurven statistisch signifikant unterscheiden. Daraus ergibt sich die Geruchsunterscheidungszeit. Die Zeit zwischen den einzelnen Versuchen gibt Auskunft über den Motivationsstatus der Maus und ist wichtig für die Interpretation eines Experiments.

Die Messung des Leckverhaltens zeigt einerseits, ob die Belohnung in Anspruch genommen wurde und somit Lernen stattgefunden hat. Andererseits gibt sie weitere



5s kann der nächste Versuch gestartet werden. Die Geruchsstoffe werden in randomisierter Reihenfolge gegeben.

3. Messparameter und deren Auswertung

Durch die Überwachung der Lichtschranke kann mit hoher Zeitauflösung gemessen werden, ob sich der Kopf der Maus im Riechzylinder befindet. Bei einem belohnten Geruch wird die Maus in den meisten Fällen den Kopf im Riechzylinder belassen (grüne S+ Kurve, Mittelwert \pm Standardabweichung. Die Verteilung der Werte ergeben sich aus seltenen Fehlentscheidungen der Mäuse.). Bei nicht belohnten Gerüchen wird sie den Kopf meistens schnell herausziehen (rote S- Kurve, Mittelwert \pm Standardabweichung). Aus etwa hundert Versuchen lässt sich dann

Auskunft über den **Motivationsstatus** der Mäuse. Die Maus sollte nur bei Applikation eines belohnten Geruchsstoffs lecken, ansonsten werden die Antworten als falsch eingestuft. Somit kann die Zahl der richtigen Entscheidungen (**Zuverlässigkeit**) ermittelt werden und als **Lernkurve** dargestellt werden (Exkurs 1D). Beim initialen Lernen der Unterscheidung von Cineol und Eugenol benötigen die Mäuse 800-1200 Versuche, um ca. 95% richtige Antworten zu erreichen. Danach können Amylacetat (AA) und Ethylbutyrat (EB) bereits nach 300 Versuchen sehr zuverlässig unterschieden werden. Das Lernen binärer Mischungen nimmt etwas mehr Zeit in Anspruch. Durch intermittierendes Testen von bereits gelernten Geruchsstoffpaaren lässt sich auch das **Geruchsgedächtnis** testen. Abbildungen verändert nach (Abraham et al. 2004).

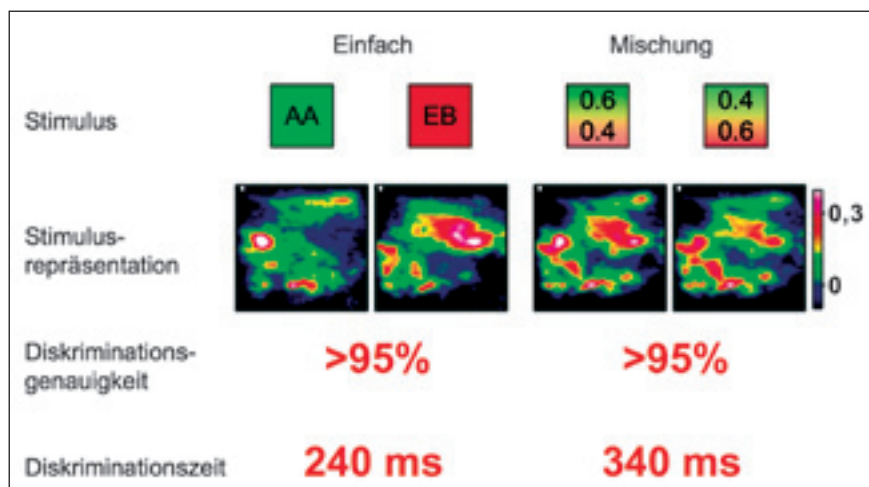


Abb. 1: Stimulus, Stimulusrepräsentation und Stimulusdiskrimination. Monomolekulare Duftstoffe Amylacetat (AA) und Ethylbutyrat (EB) und deren ‚binäre‘ Mischungen (60% AA und 40% EB bei einer Gesamtkonzentration von 1% Geruchsstoff in Mineralöl). Die Ähnlichkeit der Stimuli ist durch eine Farbskalierung visuell wiedergegeben. In vivo Bildgebung mit spannungsabhängigen Farbstoffen. Diese werden im Experiment durch eine Kraniektomie direkt auf die Hirnoberfläche aufgebracht und lagern sich in Nervenzellmembranen ein. Änderung der Membranspannung resultiert dann in einer Änderung der Fluoreszenz, die mit einer Kamera mit guter räumlich-zeitlicher Auflösung direkt von der dorsalen Oberfläche des Bulbus olfactorius gemessen werden kann. Die Abbildung zeigt nur einen Zeitpunkt wenige hundert Millisekunden nach der Geruchsstoffgabe. Die Farbskalierung reicht von 0 bis 0.4 Promille an Intensitätsveränderung nach Stimulusgabe relativ zum Hintergrund (warme Farben zeigen Regionen starker Aktivierung). Das Bild zeigt einen Großteil der Oberfläche des dorsalen Bulbus olfactorius, der linke Bildrand entspricht der anterioren und der obere Bildrand der lateralen Begrenzung. Die weiße Scheibe in der linken oberen Ecke repräsentiert die ungefähre Größe eines Glomerulus mit einem Durchmesser von 80 μm . Die Zuverlässigkeit, mit der die Maus eine richtige Unterscheidung trifft, ist in Prozent angegeben, die Zeit, welche dazu notwendig ist, in Millisekunden. Verändert nach (Abraham et al. 2004).

kriminationszeiten bei binären Mischungen fanden sich in allen bisher getesteten Duftstoffpaaren. Diese Beobachtungen legen den Schluss nahe, dass für die Unterscheidung von sich ähnlichen Geruchsstoffen neuronale Verarbeitungsvorgänge im olfaktorischen System stattfinden, welche Zeit benötigen, um Unterschiede in den afferenten Aktivitätsmustern hervorzuheben und damit ein erfolgreiches Geruchsunterscheidungsverhalten zu ermöglichen. Welche neuronalen Mechanismen liegen diesen zugrunde und benötigen bis zu 100 ms mehr Verarbeitungszeit?

Anatomie des olfaktorischen Systems

Um diese Frage beantworten zu können bedarf es zunächst der Betrachtung der Anatomie des olfaktorischen Systems der Maus (Abbildung 2). Der Bulbus wird nach außen von der Riechnervenschicht begrenzt und besteht aus der glomerulären Schicht, der externen plexiformen Schicht, der Mitralzellschicht, der internen plexiformen Schicht und der zentral gelegenen Körnerzellschicht. Die glomeruläre Schicht besteht aus zahlreichen

kugelförmig aufgebauten Glomeruli, welche eine Spezialisierung des Neuropils darstellen und aus Dendriten von Interneuronen und Prinzipalzellen (Mitral- und Büschelzellen) sowie den Nervenendigungen der Riechsinneszellen des Riechepithels bestehen. Letztere projizieren in die Glomeruli und bilden dort Synapsen mit Dendriten von Interneuronen und Prinzipalzellen. Riechsinneszellen, die identische Riechrezeptoren exprimieren, projizieren dabei in einen oder wenige (i.A. <4) Glomeruli, selbst wenn sie über eine große Fläche des Riechepithels verteilt sind (Abbildung 2A). Somit kann ein Glomerulus als Afferenzstruktur angesehen werden, die Informationen aus einem Rezeptortyp vereinigt und damit eine Art „Eingangskanal“ darstellt. Durch die Anordnung der Glomeruli in der oberflächlichen Schicht des *Bulbus olfactorius* ergibt sich eine räumliche Karte der Eingangskanäle. Jeder Geruch erzeugt hier ein individuelles räumliches Aktivitätsmuster (Abbildung 1).

Jedem Glomerulus sind ungefähr zehn Mitralzellen zugeordnet, welche einen apikalen Dendriten und mehrere Lateraldendriten

besitzen. Ihre im Glomerulus gelegenen Apikaldendriten empfangen die Axone der Riechsinneszellen, werden aber auch von Periglomerulärzellen und anderen juxtglomerulären Zellen insbesondere sogenannten „short-axon cells“ kontaktiert. Dadurch ergibt sich eine erste lokale Verarbeitungsebene, über die Aktivität in benachbarten Glomeruli zu vergleichen (auf diese Mechanismen wird hier nicht weiter eingegangen). Die Verarbeitung zwischen verschiedenen Glomeruli erfolgt jedoch vorrangig über Körnerzellen in tiefen Schichten. Körnerzellen sind Nervenzellen ohne Axon und sind auf die dendrodendritische Kommunikation spezialisiert (Shepherd et al. 2007): die Körnerzeldendriten bilden Synapsen mit den Lateraldendriten der Mitralzellen. Diese Lateraldendriten können von enormer Länge sein und einen Großteil des *Bulbus olfactorius* durchspannen. Das Axon einer Mitralzelle zieht zu höheren Hirnregionen wie beispielsweise dem piriformen Kortex oder dem Hippocampus und transportiert das prozessierte Ausgangssignal des *Bulbus olfactorius* (Abbildung 2).

Die dendrodendritische Synapse, auch als reziproke Synapse bezeichnet, besteht aus zwei gegensätzlich angeordneten synaptischen Kontakten unterschiedlicher Polarität (Abbildung 2B): einem asymmetrischen (Gray Typ I), glutamatergen Kontakt in Richtung Körnerzelle und einem symmetrischen (Gray Typ II) GABAergen Kontakt in Richtung Mitralzelle. Durch diese Anordnung liegen im Lateraldendriten präsynaptische exzitatorische und postsynaptische inhibitorische Strukturelemente direkt nebeneinander. Im Dendriten der Körnerzelle ist es umgekehrt.

Aktionspotenziale, die in Mitralzellen ausgelöst werden, breiten sich in Lateraldendriten aus, wo sie Ausschüttung des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat bewirken (Abbildung 2B-1). Dieses bindet an postsynaptische AMPA und NMDA-Rezeptoren auf Körnerzeldendriten und resultiert in Depolarisation und Ca^{2+} -Einstrom. Diese wiederum bewirken die Ausschüttung des inhibitorischen Neurotransmitters GABA zurück auf die stimulierende Mitralzelle (Abbildung 2B-2, rekurrente Inhibition) sowie auf die Dendriten anderer Mitralzellen (Abbildung 2B-3, laterale Inhibition).

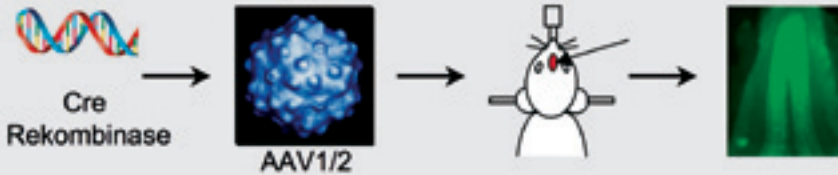
Inhibitorische Netzwerke

Diese anatomischen Betrachtungen legen nahe, dass der inhibitorischen Verarbeitung im Riechkolben eine besondere Bedeutung zukommt. Tatsächlich zeigen physiologische Messungen, dass die Geruchantwort von Mitralzellen nicht nur erregend sein kann,

Exkurs 2

Viraler Gentransfer und Stereotaxie

Viren wurden in den letzten zehn Jahren als mächtiges Werkzeug für molekulare Eingriffe in das Nervensystem etabliert. Dabei kommen bevorzugt adeno-assoziierte Viren (AAV), Adenoviren und Lentiviren



zum Einsatz. Darüber hinaus werden auch Herpesviren, Alphaviren und Pseudotollwutviren verwendet. Jedes dieser Virussysteme besitzt ein charakteristisches Eigenschaftsprofil, welches letztlich über die Auswahl des geeigneten Systems entscheidet. Allen Viren ist gemeinsam, dass mit ihnen ein fast grenzenloses Arsenal an molekulargenetischen Eingriffen

eingesetzt werden kann, um Nervenzellen gezielt zu manipulieren. Dies beinhaltet u.a. die einfache Überexpression von Proteinen, die Verwendung von RNAi, Toxinen, Cre-Rekombinase, konditionalen Expressionskassetten und Channelrhodopsinen. Diese Methoden können mit genetisch veränderten Mäusen kombiniert werden, wodurch sich die Anzahl der Möglichkeiten vervielfacht (beispielsweise die Kombination konditio-

neraler Mauslinien mit viraler Expression der Cre-Rekombinase, siehe Haupttext). Viren sind auch hervorragend dazu geeignet, Experimente zunächst in reduzierten Modellsystemen wie Zellkulturen durchzuführen und dann auf die Ebene des intakten Organismus zu skalieren.

Für die Verwendung von Viren im zentralen Nervensystem des lebenden Organismus

muss ein Weg der gezielten Gabe der Viren verfügbar sein. Hierzu eignet sich in besonderem Maße die stereotaktische Injektion von Virussuspensionen in definierte Bereiche des Gehirns. Mit dieser Methode können, abhängig von den Eigenschaften der Viren, sehr kleine Kerngebiete (z.B. Kerne des Thalamus) oder ganze Regionen (z.B. Körnerzellschicht des *Bulbus olfactorius*) mit hoher Effizienz (bis zu 95% exprimierende Zellen) infiziert werden. Darüber hinaus können auch Bedingungen geschaffen werden, unter denen nur wenige Nervenzellen infiziert werden.

Der Ablauf eines viralen *in vivo* Gentransfer-Experiments (Exkurs 2) beinhaltet die Klonierung des gewünschten Konstrukts, die Produktion und Aufreinigung infektiöser Partikel, den stereotaktischen Eingriff mit der Injektion der Virussuspension in das Zielgebiet und den Zeitraum der Expression (je nach System 12h bis 12d). Dieser Zyklus kann in der Regel innerhalb von vier Wochen bewältigt werden, womit eine sehr flexible und auf neue Bedingungen rasch adaptierbare Methode gegeben ist.

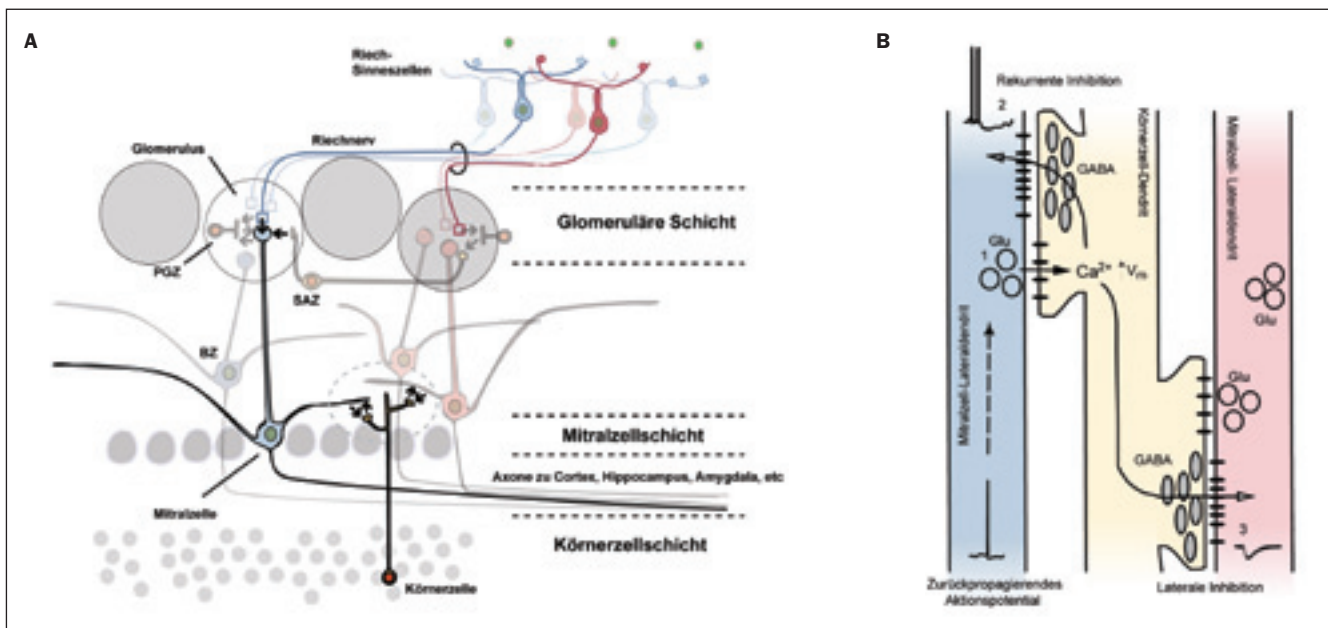


Abb. 2: Anatomischer Aufbau des *Bulbus olfactorius*.

A) Schichtung und Zelltypen des Bulbus, Riechnerv und Riechepithel (rechts oben). Glomeruli sind runde Neuropilstrukturen (Durchmesser 80 μm), welche aus Interneuronen (periglomerulären Zellen, PGZ; short-axon Zellen (SAZ)), den apikalen Dendriten der Mitral- und Büschelzellen [BZ] sowie den Endigungen der Riechsinneszellen bestehen. SAZ verbinden benachbarte Glomeruli und besitzen entgegen ihres historischen Namens teilweise sehr lange Axone. Gleichfarbig markierte Riechsinneszellen besitzen einen Rezeptortyp und projizieren in den gleichen Glomerulus. B) Funktionelle Architektur der dendrodendritischen Synapse (grau gestrichelt umrissene Region in A). Lateraldendriten der in A gezeigten Mitralzellen (blau und rot), Körnerzelle (gelb). Ovale synaptische Vesikel enthalten GABA, runde synaptische Vesikel beinhalten Glutamat als Neurotransmitter. Pfeile markieren den Fluss der Signale: Ausschüttung des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat (1), rekurrente Inhibition (2), laterale Inhibition (3).



sondern auch hemmende Antworten zu beobachten sind. So werden zum Beispiel in einer Reihe von ähnlichen Gerüchen (e.g. Aldehyde verschiedener Kettenlänge, Abbildung 3A) diejenigen Gerüche, die zu maximalen Antworten führen (C5-C7) oftmals von solchen Gerüchen „flankiert“, die hemmende Antworten hervorrufen (C4, C8). Dies legt - im Geruchsraum - eine Art der lateralen Hemmung analog zur Verarbeitung in der Netzhaut nahe (Urban 2002). In der Tat konnten intrazelluläre Ableitungen von Mitralzellen diese Auffassung zum Teil bestätigen: Luo und Katz leiteten gezielt Signale von Mitralzellen ab und korrelierten die erregende oder hemmende Antwort der Mitralzellen für verschiedene Gerüche mit den „Karten“, die durch bildgebende Verfahren gemessen werden konnten (Abbildung 3B). Sie stellten dabei zunächst fest, dass – wie zu erwarten – Mitralzellen durch solche Gerüche

stark depolarisiert werden, die auch mit den bildgebenden Techniken lokale Aktivität zeigten. In guter Übereinstimmung mit den anatomischen Bedingungen konnten die Autoren jedoch auch hemmende rezeptive Felder in der Umgebung der abgeleiteten Zelle messen. Beide Studien zeigen eine besondere Rolle der Inhibition in Hinblick auf die Aktivität und das räumliche Aktivitätsmuster auf.

Um zu untersuchen, inwieweit die Verschaltung des Riechkolbens auch die zeitliche Dynamik der Geruchsantwort beeinflusst, untersuchten Albeanu und Mitarbeiter in einer kürzlich erschienenen Studie gezielt solche Mitralzellen, die von demselben Glomerulus Eingangssignale erhalten. Solche „Schwester-Mitralzellen“ zeigen tatsächlich sehr ähnliche Geruchsprofile, wie man aufgrund der genetischen Identität der in einen Glomerulus konvergierenden Riechsinnes-

fasern erwarten würde. Allerdings konnten die Autoren bei genauer Betrachtung robuste Unterschiede in der zeitlichen Dynamik der Geruchsantwort, insbesondere in der Phase der Geruchsantwort relativ zum Atemzyklus, feststellen (Abbildung 3C). Diese kann man wiederum auf die unterschiedliche laterale Vernetzung zurückführen.

Diese und andere physiologische Ergebnisse, im Verbund mit den detaillierten Kenntnissen der Anatomie, begründen die Hypothese, dass die Inhibition eine besondere Rolle in der Geruchsverarbeitung spielt und möglicherweise die zur Verarbeitung ähnlicher Gerüche notwendige zusätzliche Zeit zumindest zum Teil auf Vorgänge in diesem inhibitorischen Netzwerk zurückzuführen ist.

Um dieser Hypothese nachzugehen, wird es notwendig, eine gezielte Veränderung des Körnerzell-Netzwerkes vorzunehm-

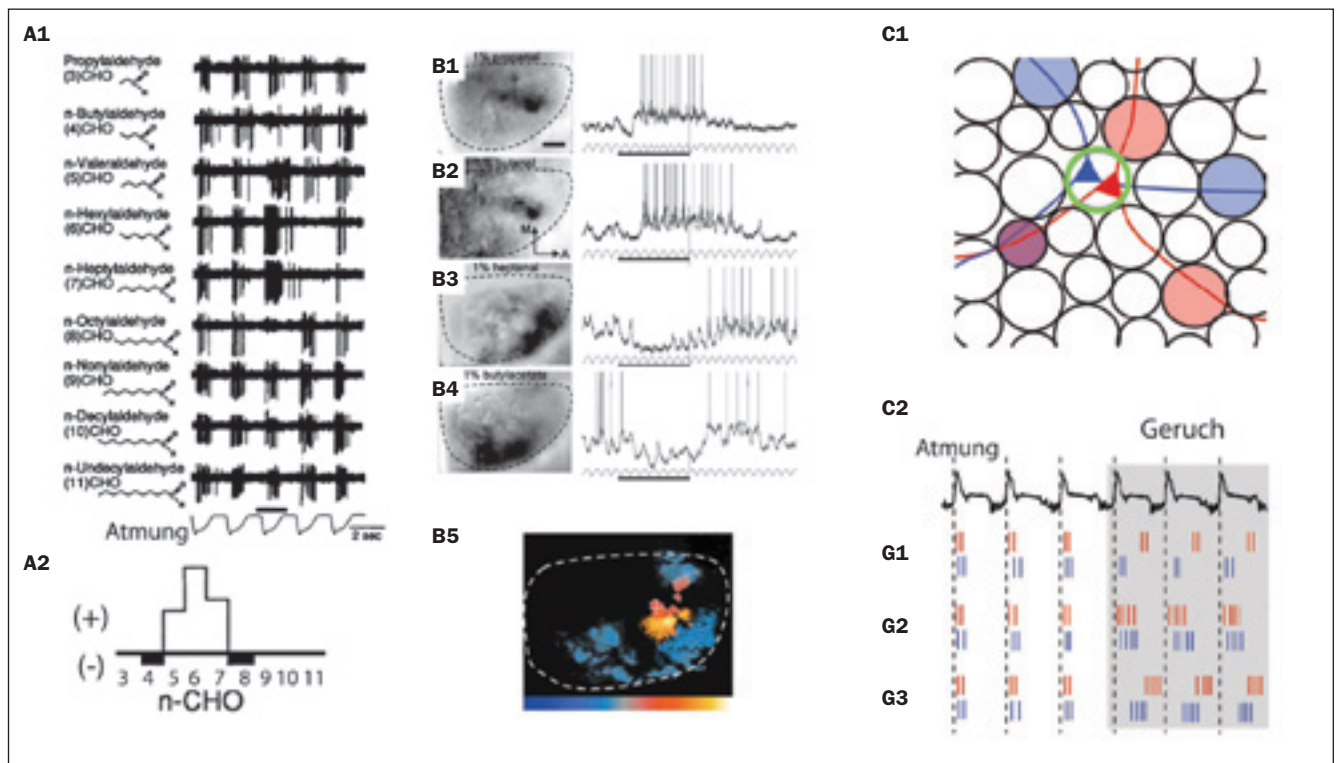


Abb. 3: A) Extrazelluläre Messungen des Aktionspotenzialfeuerns von Mitralzellen *in vivo*. Die gezeigte Zelle reagiert am Stärksten auf Stimulation (Balken) Aldehyde mit 5-7 Kohlenstoffatomen; „benachbarte“ Geruchsstoffe, d.h. Aldehyde mit Kettenlänge 4 bzw 8 inhibieren die Spontanaktivität der Zelle. A2: Feuerrate als Funktion des Geruchsstimulus. Verändert nach (Yokoi et al. 1995). B1-4 Links: Räumliches Aktivitätsmuster für 4 verschiedene Gerüche (Bildgebung mittels intrinsischer Signale von der dorsalen Seite des *Bulbus olfactorius* in einer anästhesierten Maus). Rechts: Elektrische Aktivität in einer Mitralzelle (identische Zelle für 1-4), an der mit einem Kreuz markierten Position. B5: Zusammenfassung von B1-B4 mit Regionen, die präferentiell inhibitorische (rot, gelb, vgl z.B. B1, B2) bzw exzitatorische Antworten in der gemessenen Mitralzelle hervorgerufen haben (blau, z.B. B3, B4). Abgewandelt nach (Luo und Katz 2001). C1 Schematische Skizze zweier „Schwester-Mitralzellen“, deren Primärdendrit vom selben Glomerulus (grün) Eingangssignale empfängt. Ihre Geruchsantwort wird dadurch unterschiedlich, dass beide Mitralzellen von unterschiedlichen Glomeruli (vermittelt über andere Mitralzellen sowie Körnerzellen, vgl. Abb. 2A) über ihre Lateralendriten beeinflusst werden. C2 Dies führt in zwei Schwester-Mitralzellen – je nach Geruch – zu unterschiedlichen Geruchsantworten. Unterschiede werden dabei insbesondere in der Phase des Aktionspotenzialfeuerns relativ zum Atmungszyklus sichtbar. Nach (Dhawale et al. 2010).

8th FENS FORUM OF NEUROSCIENCE

Centro de Convenciones
Internacional de Barcelona | CCIB

Organized by the
Federation of European Neuroscience
Societies | FENS
<http://www.fens.org>

Hosted by the
Sociedad Española de Neurociencia
<http://www.websenc.es/>

Scientific Programme of the FENS Forum 2012

Full details of the programme and instructions for registration and abstract submission can be obtained from <http://forum.fens.org/2012>

The website for registration and abstract submission opens on December 5, 2011

Deadline for early registration, abstract submission and stipend application for young scientists: February 5, 2012

PLENARY LECTURES

- Cori Bargmann (New York, USA)
- Daphne Bavelier (Geneva, Switzerland)
- Daniel Choquet (Bordeaux, France)
- Barry Dickson (Vienna, Austria)
- Michael Hausser (London, UK)
- Massanobu Kano (Tokyo, Japan)
- Henry Markram (Lausanne, Switzerland)
- Matthew Rushworth (Oxford, UK)
- David Tank (Princeton, USA)

SYMPOSIA

- HISTORY**
 - From electric fish to single channel neuro-electricity, one century after Bernstein's Elektrobiologie
- DEVELOPMENT**
 - Lineage reprogramming: from epigenetics to repair of neural circuits
 - Molecular regulation of neuronal migration in the developing cerebral cortex
 - Cellular and computational models of axon guidance in the developing nervous system
 - Planar cell polarity (PCP) shapes the nervous system
 - Molecular diversity and neuronal recognition
 - Early cortical activity patterns in rodents and humans: from basics to clinic
 - Genetic models of neuronal degeneration and regeneration

- EXCITABILITY, SYNAPTIC TRANSMISSION, NETWORK FUNCTIONS**
 - The regulation of synaptic NMDA receptors in development and disease
 - Calcium-permeable AMPA receptor in synaptic plasticity and memory
 - Dissecting dopaminergic pathway functions, molecular genetics and optogenetic approaches
 - Molecular basis for axon initial segment assembly and regulation of action potential generation
 - Axonal ion channel function and plasticity
 - The spine actin cytoskeleton: new molecules, maps, methods, and modulation
 - Medial entorhinal cortex: dissecting the microcircuits
 - Inhibitory functional architecture in the cerebral cortex
 - From synapses to behavior, the synaptic tagging and capture hypothesis in memory maintenance
 - Synapse rearrangements upon learning: mechanisms, specificity and roles in memory
 - Cell type-specific manipulations in reward, decision-making and motor networks
- HOMEOSTASIS IN THE NERVOUS SYSTEM**
 - Homeostasis in the nervous system
 - Advances in connectomics
 - Imaging neural circuits with genetically encoded calcium indicators
 - Brain circuit communication outside the synaptic cleft

- DISORDERS OF THE NERVOUS SYSTEM**
 - Synaptic dysfunction in models of Alzheimer's disease
 - Circuitry repair in Parkinson's disease: are we there yet?
 - Modern concepts of the epileptic focus: cellular and network organization
 - Astrocyte dysfunction and epileptogenesis
 - Brain reorganization after spinal cord injury
 - Microglia and dendritic cells, who is who?
 - Autophagy in neurodegeneration
 - Viral mediated gene transfer in CNS disorders
 - Synaptic pathology in neuropsychiatric disorders
 - The interplay between ERK and mTOR signalling in drug addiction and hyperdopaminergic disorders
 - What next generation sequencing can do for neuroscience
 - Deep brain stimulation – a new frontier in psychiatry

SENSORY AND MOTOR SYSTEMS

- Odor memory and perception: cells to circuits
- Thalamus – cortex interplay in perception, cognition and action: thalamocortical cell diversity
- Conversion of sensory signals into motor commands
- Motor awareness – how movements of the body are perceived
- Development and function of circuitry that computes direction selectivity in the retina
- Cortical interneurons in visual processing
- Visual abilities independent from visual cortex in monkeys and men
- Modulating factors for visual attention: arousal, space, and reward
- Serotonin in normal and pathological spinal motor function

HOMEOSTATIC AND NEUROENDOCRINE SYSTEMS

- Circuits of motivation: network principles of the hypothalamus
- Inducing brain plasticity through sleep
- Neurons and mitochondria: no thoughts without energy

COGNITION AND BEHAVIOUR

- The cognitive neuroscience of inhibitory control: new perspectives and challenges
- The relationship between attention, expectation and awareness in human perception
- The role of brain oscillations in speech processing: mechanisms and emerging computation principles
- The adolescent brain
- Mechanisms underlying working memory in rodents
- Creating stable memories: a delicate division of labour between hippocampus and cortex
- Amygdala inhibitory circuits and the control of fear
- The mechanics of the emotional brain: dissecting fear and aggression in limbic circuits

NOVEL METHODS AND TECHNOLOGY DEVELOPMENT

- Optogenetics: light-driven actuator and light-emitting reporter proteins for systems physiology

WORKSHOPS

- Neuro-optoelectronics: a new approach in basic and applied neuroscience
- Advanced optical methods for patterned optogenetics
- Technical aspects of large scale in vivo and in vitro recording from neurons
- Mapping the brain using fMRI decoding techniques

SPECIAL LECTURES

- Host Society (SENC) Lecture: Jose Delgado Garcia (Spain)
- Boehringer Ingelheim FENS Research Award Lecture
- DANA: MaxCowan Lecture
- Dargut and Milena Kemali Foundation Lecture
- EBBS Prize Lecture
- EJM Award Lecture
- ERA-NET NEURON Young Award Lecture
- Fondation IPSEN Award Lecture
- Lundbeck Foundation: The Brain Prize 2011 Lecture: Peter Somogyi (UK), Tamas Freund (Hungary) and György Buzsáki (USA)
- Hertie Foundation Lecture

EJN SPECIAL FEATURE

SPECIAL EVENTS

- NENS symposium
- FENS / IBRO Alumni Symposium
- And many others

SATELLITE EVENTS

POSTERS



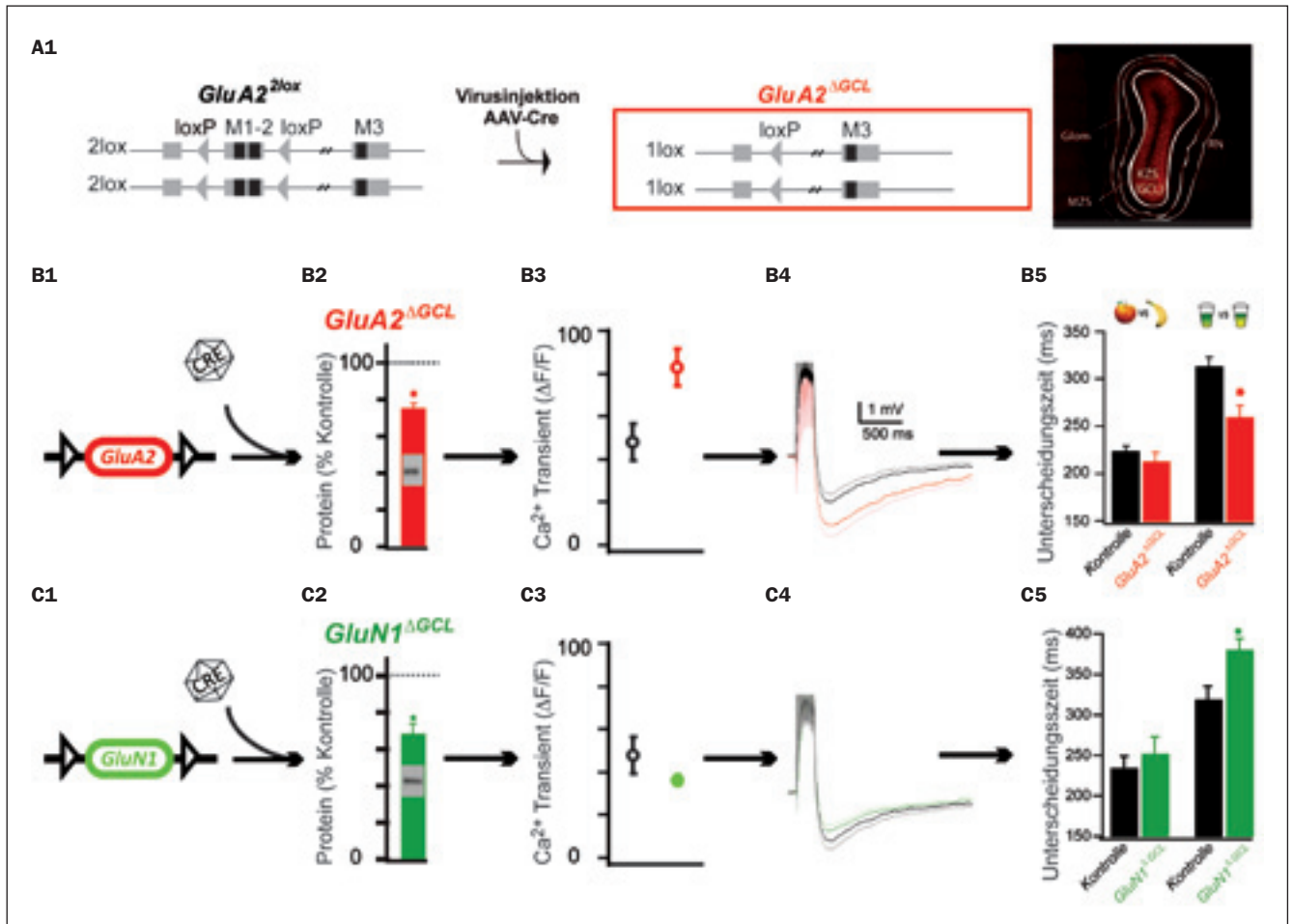


Abb. 4: A) Strategie zur gezielten genetischen Veränderung von Körnerzellen. A1: Ausgangspunkt ist eine transgene Mauslinie, bei der gezielt das Zielgen (hier die AMPA-Rezeptor-Untereinheit GluA2) von „loxP“-Schnittstellen flankiert wurde. Durch die Expression des Enzyms Cre-Rekombinase wird die DNA an diesen loxP-Stellen zerschnitten, sodass das Zielgen in den Zellen, in denen Cre-Rekombinase exprimiert wird, ausgeschaltet wird. Cre-Expression erfolgt durch gezielte Injektion eines als Genfähre fungierenden Adenoassozierten Virus („AAV-Cre“). A2 Durch gezielte Injektion an mehreren Stellen im *Bulbus olfactorius* kann die Infektion und damit Cre-Expression auf Zellen der Körnerzellschicht (KZS, engl. Granule Cell Layer, GCL) beschränkt werden. MZL: Mitralzellschicht, Glom: Glomeruläre Schicht, RN: Riechnerv. Rot: Virusvermittelte Cre-Expression. B) Virusvermitteltes Entfernen von GluA2 in Körnerzellen (B1) resultiert in einer Reduktion von GluA2-Protein (B2), erhöhtem Kalzium-Einstrom in Körnerzellsynapsen (gemessen mittels Zweiphotonenmikroskopie in Hirnschnitten, B3), reduzierter Inhibition (Ganzellableitung von Mitralzellen erlaubt die Messung der rekurrenten Inhibition, B4, siehe auch Abb. 2B) und schließlich verbesserter Geruchsunterscheidung ähnlicher Mischungen (kürzere Unterscheidungszeit im Verhaltensexperiment, B5). C) beschreibt das analoge Ergebnis für ein Entfernen der NMDA-Rezeptoruntereinheit GluN1, die zu reduziertem Kalzium-Einstrom, reduzierter Inhibition und verschlechterter Geruchsunterscheidungsfähigkeit führt (verändert nach Abraham et al. 2010).

men und die Konsequenz einer solchen Veränderung durch die verschiedenen Beschreibungsebenen – Zelle, Netzwerk, Verhalten – analytisch zu verfolgen. Die vielleicht größte Herausforderung dabei ist es, den Eingriff räumlich und zeitlich präzise zu kontrollieren. Die Beschränkung auf einen definierten anatomischen Raum ist notwendig, um ausschließlich das genannte Körnerzell-Netzwerk zu verändern, ohne solche Hirnareale zu stören, die zum Beispiel für die Ausführung der Bewegungsabläufe oder den generellen Entscheidungsprozess von Bedeutung sind.

Darüber hinaus ist auch der Zeitpunkt des Eingriffes entscheidend, da die Maus vom Embryo bis zum adulten Organismus viele wohlkoordinierte Reifungsschritte durchläuft, deren Störung durch Eingriffe wiederum unerwünschte und schwer zu kontrollierende Sekundäreffekte bewirken kann. Genetische Veränderungen – zum Beispiel die gezielte Entfernung („Ausknocken“) einzelner Gene – manipulieren im Allgemeinen jedoch Zielgene in jeder Körperzelle und oftmals schon während der vorgeburtlichen Entwicklung. Moderne genetische Techniken erlauben es nun, gezielt

ein einzelnes Gen mit speziellen Schnittstellen, sogenannten loxP-Stellen, zu flankieren. Wird dann Cre-Rekombinase, ein aus Bakteriophagen stammendes Enzym, in einer Zelle exprimiert, so wirkt diese Rekombinase wie eine molekulare Schere, die das Gen an den loxP-Stellen irreversibel ausschneidet. Durch die räumliche Kontrolle der Expression von Cre-Rekombinase und zum Beispiel Restriktion auf Gruppen von Neuronen können somit im Prinzip genetische Veränderungen auf eben diese Gruppen von Neuronen beschränkt werden. Der Zeitpunkt der Expression der

Cre-Rekombinase bestimmt wiederum, in welchem Stadium der Mausentwicklung der Eingriff stattfindet. Um dies auf die Körnerzellen des *Bulbus olfactorius* anzuwenden, muss ein Promotor gefunden werden, der ausschließlich in Körnerzellen und erst im adulten Stadium exprimiert wird. Solch spezifische Promotoren zu finden ist zwar theoretisch möglich, aber im Allgemeinen sehr unwahrscheinlich. Alternativ besteht die Möglichkeit, Viren, die als Genfähren die Information zur Herstellung von Cre-Rekombinase tragen, gezielt durch stereotaktische Injektionen in das Zentrum des *Bulbus olfactorius* adoleszenter Mäuse einzubringen (Abbildung 4A, Exkurs 2). Auf diese Weise können beliebige Zielgene spezifisch ausgeschaltet werden – vorausgesetzt es existiert eine Mauslinie, in der das Zielgen von loxP-Schnittstellen flankiert ist. Solche „gefloxten“ Mauslinien herzustellen ist zwar sehr aufwändig, wird jedoch in vielen Laboren aufgrund der großen experimentellen Vorteile verfolgt.

Zur Veränderung der inhibitorischen Verschaltung bieten sich speziell Zielgene an, die eine Bedeutung in der synaptischen Übertragung von Mitralzellen auf Körnerzellen haben. Wir konnten dabei zeigen, dass – wie aus anderen Hirnregionen bekannt – eine Entfernung der GluA2-Untereinheit zu einem vermehrten Einstrom von Kalziumionen in Körnerzellen führt (Abbildung 4B1-B3; Abraham et al. 2010). Dieser wiederum bedingt einen deutlichen Anstieg der Inhibition auf Mitralzellen, wie man aufgrund der verwickelten Architektur der dendrodendritischen Synapse erwarten würde (Abbildung 2B, 4B4, Abraham et al. 2010). Untersucht man auf diese Art gezielt genetisch veränderte Mäuse auf ihre Fähigkeit, Gerüche zu unterscheiden, so kann man feststellen, dass Geruchslernen und -Gedächtnis sich nicht von Kontrollgruppen unterscheiden und sich auch in allgemeinen Verhaltenstests aufgrund der sehr regionalen Veränderung keine Unterschiede zeigen. Bei der Messung der Verarbeitungsgeschwindigkeit waren allerdings deutliche Veränderungen sichtbar (Abbildung 4B5, Abraham et al. 2010). Zwar war die einfache Geruchsunterscheidung ähnlich schnell wie in Kontrolltieren, zur Unterscheidung sehr ähnlicher Geruchsmischungen benötigten die genetisch veränderten Tiere mit erhöhter Inhibition allerdings deutlich weniger Zeit; Sie waren schneller als ihre Kontrollartgenossen im selben Experiment! Eine analoge Modifikation der GluN1-Untereinheit, die zu geringerem Kalziumeinstrom und damit geringerer Inhibition (Abbildung 4C1-C4; Abb 2B) führte, zeigte den genau

gegenteiligen Effekt: Bei unveränderter Lern- und Gedächtnisleistung benötigte die Unterscheidung ähnlicher Gerüche signifikant mehr Zeit (Abbildung 4C5; Abraham et al. 2010).

Zusammen mit weiteren physiologischen und Verhaltensexperimenten an genetisch veränderten Tieren zeigen diese Versuche, dass das inhibitorische Netzwerk des *Bulbus olfactorius* in der Tat von wesentlicher Bedeutung in der Geruchsprozessierung ist. Ein Großteil der Gedächtnisleistungen – zumindest für einfache Geruchsunterscheidungsparadigmen – ist wiederum primär dem olfaktorischen Kortex und insbesondere der Plastizität im piriformen Kortex zuzuschreiben.

Literatur

- Abraham, N.M. et al. (2004): Maintaining accuracy at the expense of speed: stimulus similarity defines odor discrimination time in mice. *Neuron* 44 (5): 865-876.
- Abraham, N.M. et al. (2010): Synaptic inhibition in the olfactory bulb accelerates odor discrimination in mice. *Neuron* 65 (3):399-411 (in eng).
- Mombaerts, P. (2004): Genes and ligands for odorant, vomeronasal and taste receptors. *Nat Rev Neurosci* 5 (4): 263-278 (in eng).
- Shepherd, G.M., Chen, W.R., Willhite, D., Migliore, M. und Greer, C.A. (2007): The olfactory granule cell: from classical enigma to central role in olfactory processing. *Brain Res Rev* 55 (2): 373-382 (in eng).
- Urban, N.N. (2002): Lateral inhibition in the olfactory bulb and in olfaction. (Translated from eng) *Physiol Behav* 77 (4-5): 607-612 (in eng).

Eine vollständige Literaturliste ist bei e-Neuroforum, der englischen Online-Version bei Springer-Link, zu finden.

Kurzbiografien

Andreas Schaefer: 1995-2000: Studium der Physik (Nebenfach Zellbiologie), Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg als Stipendiat der Studienstiftung des Deutschen Volkes

2000-2001: Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Department of Experimental Psychology, Oxford, UK

2001-2004: Promotion Biologie, MPI f. med. Forschung, Universität Heidelberg bei Bert Sakmann als Stipendiat der Boehringer Ingelheim Fonds und WIN-Kollegiat der Heidelberger Akademie der Wissenschaften

2004-2007: Postdoktorand bei Troy Margrie, Department of Physiology, University College London, UK, gefördert durch die Leopoldina Akademie der Wissenschaften und die EMBO

2007-2008: David Phillips Fellow und Gruppenleiter, Department of Physiology, UCL, UK

seit 2008: Selbständiger Nachwuchsgruppenleiter MPI f. med. Forschung, Heidelberg
2009: Berufung auf die Forschungsprofessur Neurowissenschaften, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Thomas Kuner: 1988-1998: Studium der Medizin, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg als Stipendiat der Studienstiftung des Deutschen Volkes

1992-1997: Promotionsarbeit bei Prof. Dr. Peter H. Seeburg, Zentrum für Molekulare Biologie der Universität Heidelberg (ZMBH)

1998-2000: Postdoktorand bei Prof. George Augustine Duke University Medical Center, Durham, NC und Marine Biological Laboratory, Woods Hole, MA, USA; Feodor-Lynen Stipendiat der Alexander-von-Humboldt-Stiftung, Stipendiat des “Human Frontiers in Science Program”, Grass Fellowship in Neurosciences

2000-2006: Arbeitsgruppenleiter, Abteilung für Zellphysiologie, Prof. Dr. Bert Sakmann, Max-Planck-Institut für medizinische Forschung, Heidelberg; Stipendium der Claussen-Simon-Stiftung

2002-2005: Leiter der Interdisziplinären Forschergruppe „WIN-Olfactory Dynamics Group“ und Kollegiat der Heidelberger Akademie der Wissenschaften

2003: Habilitation für das Fach Physiologie, Universität Heidelberg

seit 2006: Professor am Institut für Anatomie und Zellbiologie, Universität Heidelberg.

Korrespondenzadressen

Prof. Dr. Thomas Kuner
Universität Heidelberg
Anatomie und Zellbiologie
Im Neuenheimer Feld 307
69120 Heidelberg
Tel.: +49 6221 548 678
Fax: +49 6221 544 952
E-Mail: kuner@uni-heidelberg.de

Dr. Andreas T. Schaefer
Max Planck Research Group
Behavioural Neurophysiology
Max-Planck-Institut für medizinische Forschung
Max Planck Forschergruppe
Verhaltensneurophysiologie
Jahnstr. 29
69120 Heidelberg
Tel.: +49 6221 486 408
E-Mail: schaefer@mpimf-heidelberg.mpg.de
a.schaefer@uni-heidelberg.de