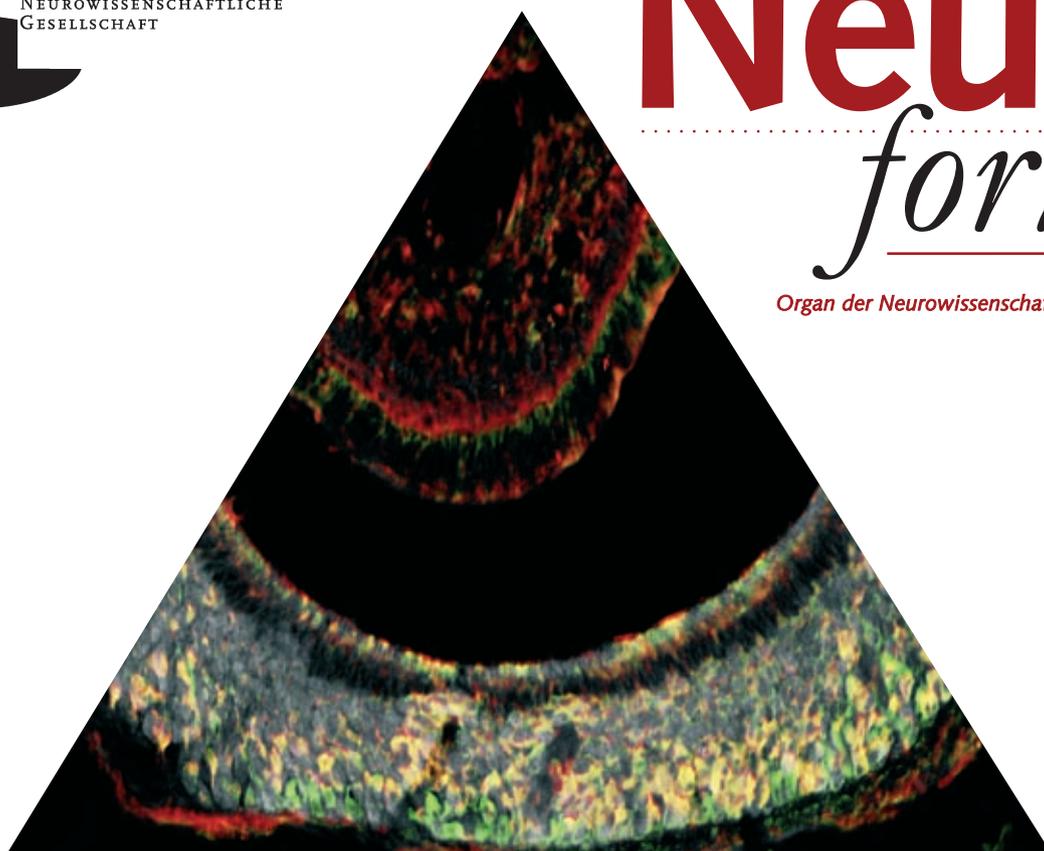


Perspektiven der Hirnforschung



Neuro forum

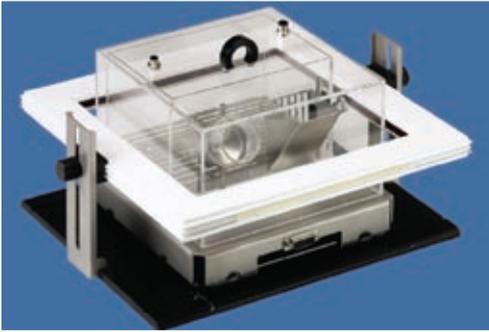
Organ der Neurowissenschaftlichen Gesellschaft



Das Mittelohr-Cholesteatom: zur Aufklärung der chronischen Mittelohrentzündung

Soziale Signale erschnüffeln: chemische Kommunikation und das Vomeronasalorgan

Das neuronale Netzwerk der Inneren Uhr



Panlab | HARVARD APPARATUS



Physiocage

Kombiniertes System zur Messung von:

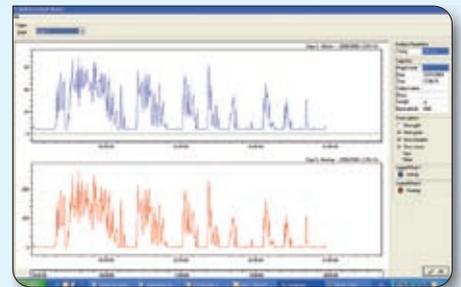
- Atem-Stoffwechsel
- Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme
- Aktivität und Rearing

Panlab Physiocage ist ein modulares System, das die Kombination der Messungen von Atem-Stoffwechsel (O_2 Verbrauch / CO_2 Produktion), Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme, Aktivität und Rearing in speziell angepassten Käfigen ermöglicht.

Dank seiner richtungweisenden Technologie kann das System problemlos auf eine Vielzahl von Anwendungen erweitert werden.

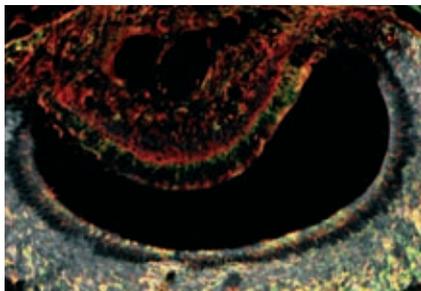
Die wichtigsten Highlights auf einen Blick:

- Problemlos erweiterbares System in verschiedensten Konfigurationen **bis zu 32 Physiocages**
- Hoch empfindliche und stabile Sensoren für O_2 und CO_2
- Die Bestimmung der Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme sowie der Aktivität erfolgt durch die neuartige Wäge-Technologie. Dies gewährleistet eine besonders hohe Genauigkeit und Stabilität
- Ein externer Nahrungs- und Flüssigkeitsdispenser vermeidet unerwünschte Artefakte und jeden Einfluss auf den Lebensraum des Tieres
- Mit Hilfe von speziell angepassten Systemen werden Aufnahme und Verwertung von Nahrung und Flüssigkeit registriert
- Mit einem zusätzlichen Infrarot-Rahmen kann das Rearing gemessen werden



Date/Time	O2	CO2	Weight
2010-01-01 10:00	21.00000000	0.00000000	21.00000000
2010-01-01 10:05	20.99999999	0.00000000	21.00000000
2010-01-01 10:10	20.99999999	0.00000000	21.00000000
2010-01-01 10:15	20.99999999	0.00000000	21.00000000
2010-01-01 10:20	20.99999999	0.00000000	21.00000000
2010-01-01 10:25	20.99999999	0.00000000	21.00000000
2010-01-01 10:30	20.99999999	0.00000000	21.00000000
2010-01-01 10:35	20.99999999	0.00000000	21.00000000
2010-01-01 10:40	20.99999999	0.00000000	21.00000000
2010-01-01 10:45	20.99999999	0.00000000	21.00000000
2010-01-01 10:50	20.99999999	0.00000000	21.00000000
2010-01-01 10:55	20.99999999	0.00000000	21.00000000
2010-01-01 11:00	20.99999999	0.00000000	21.00000000
2010-01-01 11:05	20.99999999	0.00000000	21.00000000
2010-01-01 11:10	20.99999999	0.00000000	21.00000000
2010-01-01 11:15	20.99999999	0.00000000	21.00000000
2010-01-01 11:20	20.99999999	0.00000000	21.00000000
2010-01-01 11:25	20.99999999	0.00000000	21.00000000
2010-01-01 11:30	20.99999999	0.00000000	21.00000000
2010-01-01 11:35	20.99999999	0.00000000	21.00000000
2010-01-01 11:40	20.99999999	0.00000000	21.00000000
2010-01-01 11:45	20.99999999	0.00000000	21.00000000
2010-01-01 11:50	20.99999999	0.00000000	21.00000000
2010-01-01 11:55	20.99999999	0.00000000	21.00000000





Zum Titelbild: Konfokale Immunfluoreszenzaufnahme des Vomeronasalorgans der Maus, koronaler Kryoschnitt (s. Artikel von Marc Spehr S. 114 ff)



**Vorstand der
Amtsperiode 2009/2011**

Präsident:
Prof. Dr. Sigrun Korsching, Köln

Vizepräsident:
Prof. Dr. Herta Flor, Mannheim

Schatzmeister:
Prof. Dr. Andreas Draguhn, Heidelberg

Generalsekretär:
Prof. Dr. Ulrich Dirnagl, Berlin

*Sektionssprecher
Computational Neuroscience:*
Prof. Dr. Ad Aertsen, Freiburg

Entwicklungsneurobiologie/Neurogenetik:
Prof. Dr. Michael Frotscher, Freiburg

Klinische Neurowissenschaften:
Prof. Dr. Mathias Bähr, Göttingen

Kognitive Neurowissenschaften:
Prof. Dr. Andreas Engel, Hamburg

Molekulare Neurobiologie:
Prof. Dr. Eckart Gundelfinger, Magdeburg

Neuropharmakologie und -toxikologie:
Prof. Dr. Rainer Schwarting, Marburg

Systemneurobiologie:
Prof. Dr. Stefan Treue, Göttingen

Verhaltensneurowissenschaften
Prof. Dr. Monika Stengl, Kassel

Zelluläre Neurobiologie:
Prof. Dr. Hanns Hatt, Bochum

INHALT	139
EDITORIAL	140
HAUPTARTIKEL	
Jürgen-Theodor Fränzer und Holger Sudhoff Das Mittelohr-Cholesteatom: eine Reise zur Aufklärung der Ursache dieser aggressiven Form der chronischen Mittelohrentzündung	141
Charlotte Helfrich-Förster Das neuronale Netzwerk der Inneren Uhr	151
Marc Spehr Soziale Signale erschnüffeln: Chemische Kommunikation und das Vomeronasalorgan	157
ARTIKEL DES QUARTALS	
Grathwohl, S.A., Kälin, R.E., Bolmont, T., Prokop, S., Winkelmann, G., Kaeser, S.A., Odenthal, J., Radde, R., Eldh, T., Gandy, S., Aguzzi, A., Staufenbiel, M., Mathews, P.M., Wolburg, H., Heppner, F.L. und Jucker, M. Formation and maintenance of Alzheimer's disease beta-amyloid plaques in the absence of microglia	164
AUSSTELLUNGSVORSTELLUNG	
Dein Gehirn – denken, fühlen, handeln Eindrücke aus einer Ausstellung im Weltkulturerbe „Völklinger Hütte“	168
NACHRICHTEN AUS DER NEUROWISSENSCHAFTLICHEN GESELLSCHAFT	
Neues auf der NWG-Homepage	150
NACHRICHTEN AUS DER DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT	
Open-Access-Publizieren – Merkblatt für Universitäten zur Antragstellung erschienen Ursula M. Händel-Tierschutzpreis – 50.000 Euro für den Tierschutz in der Forschung	167 169
BÜCHER	
Vom Geist zum Molekül, and back again - Gedächtnis. Die Natur des Erinnerns	169
AUSBLICK	170
IMPRESSUM	170

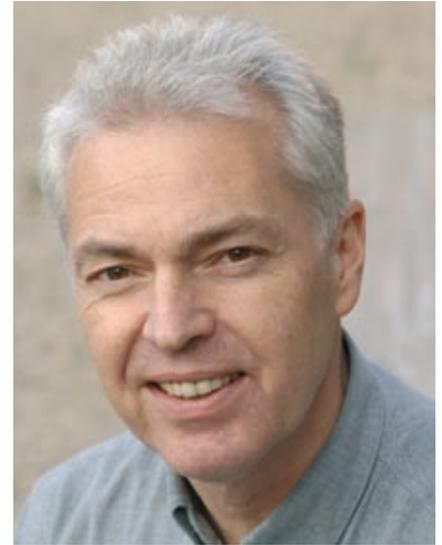


Neuroforum Online in englischer Sprache

Was lange währt wird endlich gut! Nach langen Verhandlungen wird ab der ersten Ausgabe 2010 zusätzlich zur gedruckten deutschen Ausgabe von Neuroforum eine englische Online-Version der Übersichtsartikel bei Springer Link verfügbar sein. Vor mehr als vier Jahren hatte die Geschäftsstelle eine Umfrage bei den NWG-Mitgliedern und den Abonnenten von Neuroforum durchgeführt, die unter anderem auch die Frage nach dem Wunsch nach einer englischen Ausgabe von Neuroforum stellte.

Das Votum war recht eindeutig: Die Leser von Neuroforum wollten auch in Zukunft auf ein gedrucktes Exemplar von Neuroforum nicht verzichten, würden es aber begrüßen, wenn die Artikel zusätzlich auch in englischer Sprache verfügbar wären. Für viele NWG-Mitglieder, die

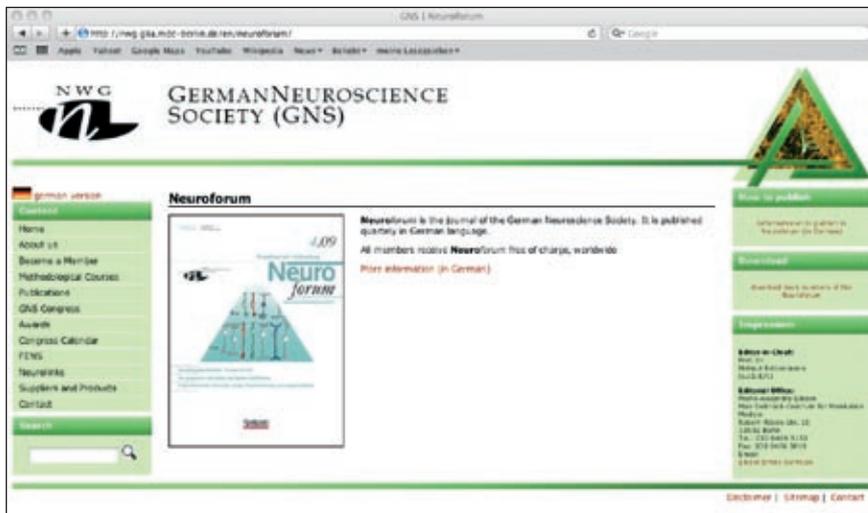
das Spektrum seiner Autoren erweitern kann. Ab jetzt können die Artikel entweder in Deutsch oder auf Englisch eingereicht werden und werden vice versa übersetzt. So können auch in Deutschland arbeitende ausländische Wissenschaftler problemlos in Neuroforum publizieren. Bisher hielt die Deutschsprachigkeit der Übersichtsartikel diese Autoren häufig davon ab, für Neuroforum zu schreiben, auch wenn sie schon lange in einem deutschen Umfeld tätig waren. Und nicht nur seitens der Autoren ist diese neue Variante von Neuroforum ein Vorteil, die NWG wird durch dieses erweiterte Angebot auch für die nicht deutschsprachigen Neurowissenschaftler, die in Deutschland arbeiten, attraktiver. Möglich geworden ist diese Entwicklung durch die Übernahme des Spektrum Akademischen Verlags durch den Springer Verlag. Dieser



noch verbesserungsfähig. Anregungen, Kommentare und konstruktive Kritik sind daher herzlich willkommen.

Viel Spaß bei der Lektüre!

Helmut Kettenmann
Chefredakteur Neuroforum



entweder als Studenten Neuroforum für einen einfachen Einstieg in die Neurowissenschaften nutzen oder die als Lehrende an Universitäten auf Neuroforum als Unterrichtsmaterial zurückgreifen, ist die deutsche Druckausgabe nicht wegzudenken. Eine zusätzliche englische Online-Ausgabe der Übersichtsartikel trägt zu einer weiteren Verbreitung von Neuroforum bei. Wir gehen davon aus, dass die englischsprachigen Artikel mittelfristig auch zitiert werden, da sie der internationalen Wissenschafts-Community über das Portal von Springer zur Verfügung stehen. Ein weiterer Vorteil der zweisprachigen Artikel besteht darin, dass Neuroforum

verfügt über die entsprechenden technischen und personellen Voraussetzungen, um Neuroforum problemlos und für die NWG nahezu kostenneutral in englischer Sprache online zu stellen.

Ich möchte alle NWG Mitglieder auffordern, sich Neuroforum Online anzuschauen und vor allem ausländische Kollegen, die in ihren Forschergruppen arbeiten, auf die Seite aufmerksam zu machen. Alle Mitglieder bekommen Anfang März eine Nachricht vom Springer Verlag, die die Zugangsdaten zu Neuroforum Online enthält. Die Ausgabe 1/2010 ist der erste Versuch und wie alle gerade aus der Wiege gehobenen Unternehmungen sicherlich

Das Mittelohr-Cholesteatom: eine Reise zur Aufklärung der Ursache dieser aggressiven Form der chronischen Mittelohrentzündung

Jürgen-Theodor Fränzer und Holger Sudhoff

Zusammenfassung

Das Cholesteatom tritt an verschiedenen Lokalisationen im Felsenbein, das u.a. das Mittelohr beherbergt, auf. Es können Gehörgangs-, Mittelohr- und Felsenbeinspitzen-Cholesteatome unterschieden werden. Die häufigsten Mittelohr-Cholesteatome lassen sich in angeborene oder kongenitale und erworbene Cholesteatome unterteilen. Es sind verschiedene Hypothesen zur Entstehung dieser aggressiven Form von Mittelohrentzündungen aufgestellt und teilweise wieder verworfen worden.

Wir untersuchen die mögliche Entstehung von Cholesteatomen u.a. durch bakterielle Superinfektionen. Hierzu setzen wir moderne molekular- und zellbiologische als auch immunhistochemische Techniken an menschlichem Untersuchungsmaterial ein, auch deswegen, weil es noch immer nicht gelungen ist, ein dem menschlichen Cholesteatom gleichendes Tiermodell zu etablieren. Wir berichten über die verschiedenen Theorien zur Entstehung von Cholesteatomen im Mittelohr und Befunde, die diese Theorien unterstützen. Viele Untersuchungen zur Hyperproliferation, zu den verschiedenen morphologischen Abschnitten von Cholesteatomen und zur Expression verschiedener Proteine vervollständigen dieses Bild. Schließlich verdeutlichen wir, dass es Hinweise gibt, dass möglicherweise eine Schwächung der antimikrobiellen innaten Abwehr der Gehörgangshaut einen entscheidenden Beitrag zur Entstehung eines Cholesteatoms darstellen kann.

Abstract

Middle ear cholesteatoma: a pathway to investigate the underlying mechanisms of the aggressive variant of chronic otitis media.

The cholesteatoma is a destructive form of chronic otitis media. Depending on its development at different sites of the human body, it will be called external ear cholesteatoma, middle ear cholesteatoma or petrous apex. Regarding the origin and underlying cause of the disease, we will discuss several distinct aetiologies.

We investigate the role of bacterial infection as a trigger. For this purpose, we use modern molecular, cellular biological and immunohistochemical approaches at human biopsy-material. We report the different theories for originating and development of cholesteatomas and the findings for supporting each hypothesis. Several experiments in regard to hyperproliferation, different morphological regions and expression of proteins in these areas complete the picture of this work. Finally, we open the view for weakness of the innate defense of the human external ear skin and its involvement in the formation of cholesteatomas.

Keywords: middle ear; cholesteatoma; cytokeratins; biofilm

Geschichte des eigentlich irreführenden Namens ‚Cholesteatom‘

Das Einwachsen von mehrschichtigem verhornenden Plattenepithel in die Mittelohrräume mit nachfolgender chronisch-entzündlicher Entzündung und Knochendestruktion wird als „Mittelohr-Cholesteatom“ bezeichnet. Der französische Anatom

Guichard Joseph DuVerney – der als einer der Väter der Otologie gilt - beschrieb vermutlich das erste Cholesteatom-ähnliche Geschwulst, was er ‚Steatoma‘ nannte (1683), also Talggeschwulst oder Talgdrüsen-geschwulst. Sein Landsmann Jean Cruveilhier definierte 1829 diese Erscheinung als Perlentumor (tumeur perleè) des Felsenbeinknochens, weil er beobachtete,

dass sie in seiner geschlossen Form einer Perle ähnelte.

Der Begriff „Chole-steat-om“ („Cholesterin-Fett-Tumor“), wurde von Johannes Müller 1838, der Cholesterinkristalle eines fetthaltigen Körpers für charakteristisch hielt, eingeführt, fälschlicherweise – heute weiß man, dass weder Fett noch Cholesterin in diesen Geschwulsten enthalten sind. Er beschrieb seinerzeit „einen geschichteten perlformigen Tumor aus Fett“. Synonyme wurden im Laufe der Zeit vorgeschlagen: ‚perlantiges Plattenepithelkarzinom‘ (Cornil und Ranvier 1891), ‚Epidermoid‘ (Critchely und Ferguson 1928), ‚Cholesteatomöse chronische Mittelohrentzündung‘ (Eckert-Möbius 1953), ‚Schwarze oder squamöse Cholesteatosis‘ (Birrell 1956, 1958) und ‚Keratom‘ (Harris und Weiss 1962), um nur eine Auswahl aufzulisten. Heute behält man den Namen ‚Cholesteatom‘ trotz seiner unkorrekten inhaltlichen Aussage wegen seiner weiten Verbreitung bei.

Cholesteatom-Phänotyp: Pathologie und Ätiologie

Es handelt sich beim Cholesteatom (im Mittelohr) um ein Geschwulst der Mittelohrräume, das aus zwiebelschalenartig angeordneten verhornenden Plattenepithelzellen (Abb. 2E) besteht, sodass es eine Epidermoidzyste darstellt. Das Cholesteatom wächst für gewöhnlich langsam und lokal destruierend. Die Destruktion ist durch einen osteoklastären Abbau des umliegenden Knochens als auch der Gehörknöchelchen bedingt. Das Cholesteatom wächst weder aktiv infiltrierend wie ein maligner Tumor, noch setzt es Metastasen, und es sind keine Neoplasmen nachweisbar – es handelt sich also nicht um einen Tumor oder Krebs.

Das Cholesteatom kann in der modernen Otologie als „chronische osteoklastische Knochenzerstörung als Folge von ortsfremdem, verhornendem Plattenepithel in den normalerweise nur mit Schleimhaut ausgekleideten Mittelohrraum mit bedrohlichen Komplikationsmöglichkeiten“ definiert werden. Die chronische Knochenerosion wird durch eine bakterielle Superinfektion getriggert. Wir stellen uns bei unseren Arbeiten in Bielefeld die Frage, ob diese Infektion nicht auch die Ursache der Entwicklung des Cholesteatoms darstellen könnte, wie Sie in diesem Beitrag verfolgen können.

Cholesteatome werden in der kaukasischen Bevölkerung mit einer Häufigkeit von 3 auf 100.000 Kindern und 9 auf 100.000 Erwachsenen bei signifikanter Prädisposition zum männlichen Geschlecht (1,4mal häufiger als beim weiblichen Geschlecht) und zu Kauka-

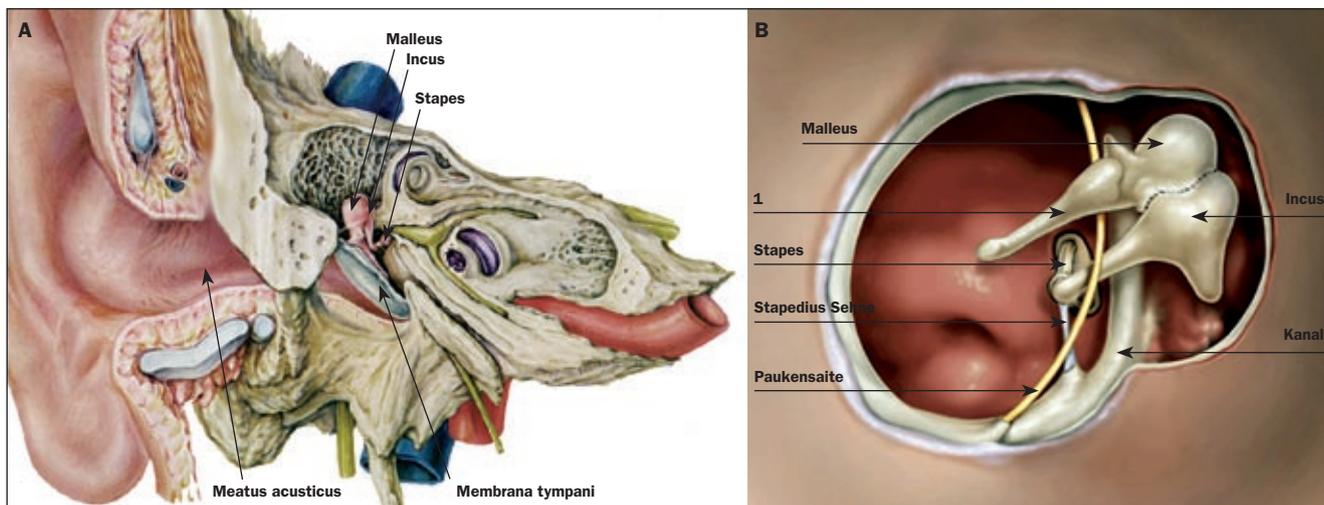


Abb. 1: (A) Schema Querschnitt menschliches Ohr mit Gehörgang (Meatus acusticus), Trommelfell (Membrana tympani) und dem Mittelohr. (B) Vergrößerung Mittelohr, Blick hinter das Trommelfell auf das rechte Mittelohr. Gut sichtbar sind die drei Gehörknöchelchen: oben der Hammer (Malleus), in der Mitte der Amboss (Incus) und ans ovale Fenster der Gehörgangsschnecke hinühfönd der Steigbügel (stapes). Das gelbe Band stellt die Paukensaite (Chorda tympani) dar, unterhalb im Hintergrund verläuft in leichtem blau die Stapediussehne an den Steigbügel sowie der Kanal mit dem Gesichtsnerven (Nervus facialis). 1 Hammergriff (aus: Hildmann, H., Sudhoff, H. Middle Ear Surgery, Springer, 2006).

siern gefunden. Bei den Inuit Eskimos ist das Auftreten signifikant geringer zu beobachten, vermutlich weil diese ethnische Gruppe einen vergrößerten Nasopharynx aufweist. Diese Vergrößerung mag eine einfachere Belüftung des Mittelohres ermöglichen und so chronische Ohrerkrankungen vermeiden helfen.

Cholesteatom-Phänotyp: Paukenhöhle, klinische Pathogenese und Aussehen

Die Paukenhöhle ist beim Menschen etwa 12-15 mm lang und 3-7 mm breit. Ihr Innenvolumen ist gering und beträgt nur etwa 1 cm³. Sie besteht aus drei Abschnitten:

Paukenkuppel (Epitympanon), Paukenmittelfraum (Mesotympanon), Paukenkeller (Hypotympanon).

Man unterscheidet nach ihrer Pathogenese zwei Formen dieser aggressiven Form von Mittelohrentzündungen. Das *kongenitale (congenital)* Cholesteatom manifestiert sich

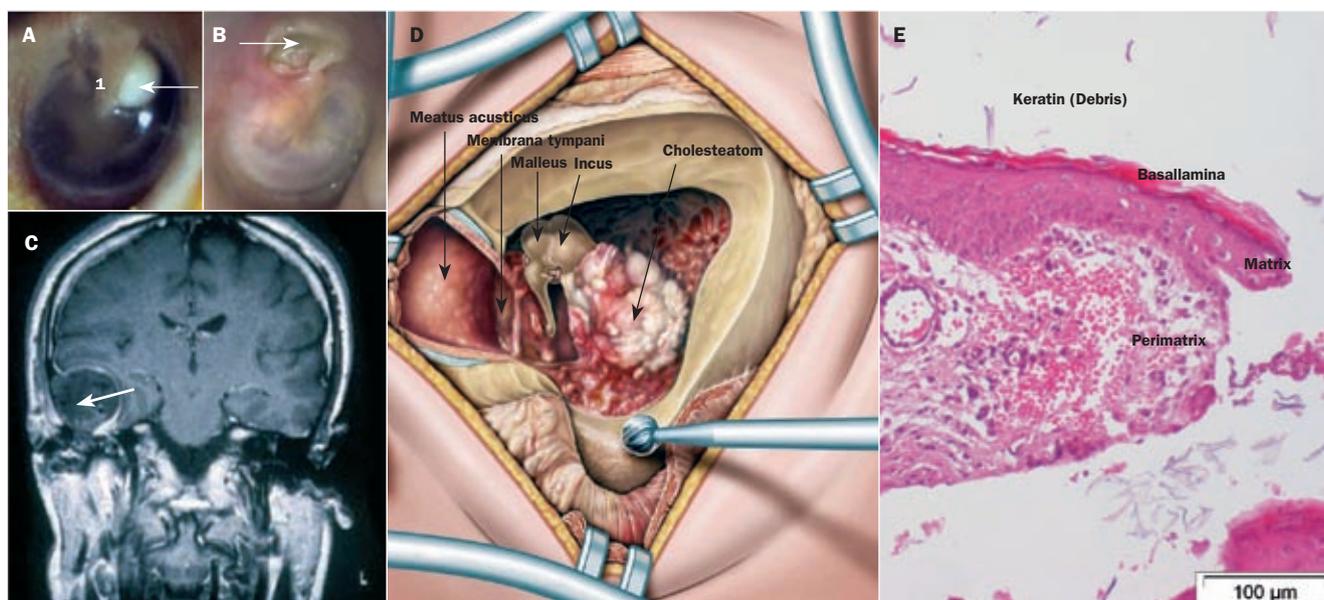
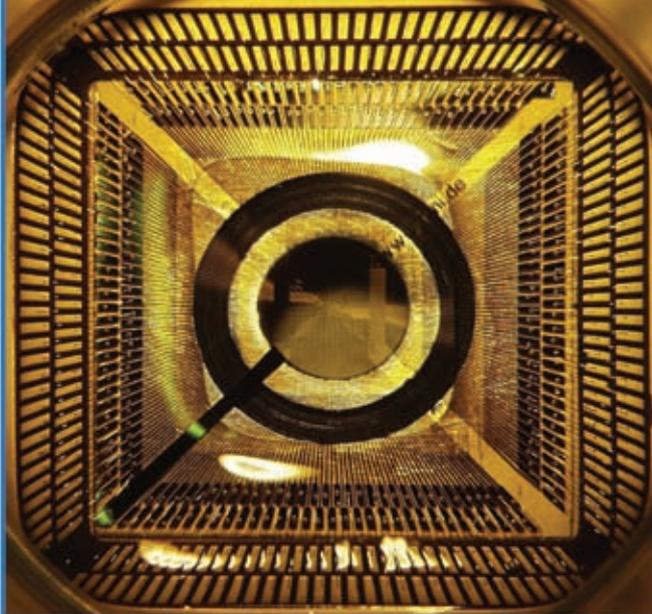


Abb. 2: (A) Kongenitales Cholesteatom bei einem dreijährigen Kind hinter intaktem Trommelfell des rechten Ohres. (B) Rechtes Trommelfell mit erworbenem Cholesteatom bei einem 53-jährigen Patienten. (C) Kernspintomographie mit Verdrängung des Temporallappens durch das Cholesteatom am rechten Gehörgang. (D) Blick des Operateurs auf ein Mittelohr-Cholesteatom beim Menschen nach Freilegung des Trommelfells des linken Ohres (Tymanoplastik) (aus: Hildmann, H., Sudhoff, H. Middle Ear Surgery, Springer, 2006). (E) Aufbau eines Cholesteatoms, HE-Färbung: histologisch handelt es sich beim Cholesteatom um eine Ansammlung verhornender (Keratindebris), zwiebelschalenartig angeordneter Epidermissmassen, deren epithelialer Anteil als Matrix bezeichnet wird. Der subepitheliale Anteil (=Perimatrix) weist in der Regel eine chronisch entzündete Reaktion auf. 1 Hammergriff (weisse Pfeile: Sitz des Cholesteatoms).



MEA*



Need high-quality electrodes?

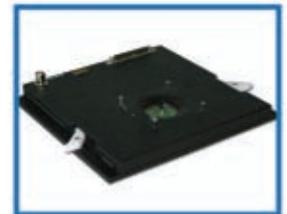
Recording:

All data acquisition systems from 16 up to 256 channels from microelectrode arrays are complete solutions for in vivo and in vitro applications. Just decide whether you prefer a system with a PC integrated Data Acquisition Card or if you need more flexibility with USB 2.0 High Speed Data Transfer.



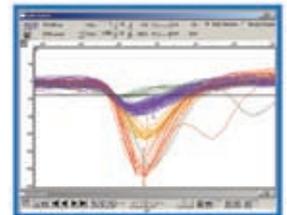
Amplifying:

Multi Channel Systems provides high-performance amplifiers for various in vitro and in vivo applications. Gain and bandwidth settings can be specified by the user. Choose between microelectrode array amplifiers, miniature pre-amplifiers, filter amplifiers, and programmable gain amplifiers.



Analyzing:

Our flexible software MC_Rack is the universal software solution for countless applications. Combine instruments into a virtual rack and analyse multiple parameters simultaneously. For specific applications, like LTP studies, we offer customized software.



Stimulating:

The Stimulus Generators of the 4000 series allow you to choose between current and voltage driven stimulation. You can select 2, 4 or 8 completely independent stimulus outputs, each of which has the ability to provide any arbitrary analog waveform. The isolation units are already integrated.



multichannel*
systems

Innovations in Electrophysiology

www.multichannelsystems.com

Picture courtesy of nmi Reutlingen



Exkurs 1

Verschiedene Theorien und Orte zur Entstehung der Mittelohr-Cholesteatome

(1) Metaplasie: Durch den Entzündungsreiz wandelt sich das vorhandene Epithel der Paukenschleimhaut in ein Plattenepithel (heute sehr umstritten).

(2) Immigration: Durch eine Trommelfellperforation (z.B. entzündlich (Maserotitis), traumatisch, mechanisch) wächst Plattenepithel in das Mittelohr ein. Dieses Epithel weist eine erhebliche Wachstumstendenz auf, die auf dem chronisch entzündlichen Reiz der Perimatrix beruht. Dieser bewirkt eine invasive Basalzellhyperplasie des verhornenden Epithels, welches anschließend desquamiert, sich abkapselt und so das Cholesteatom formt.

(3) Retraktionstaschen: Ventilationsstörungen der Eustachischen Tube führen zu Invaginationen des Trommelfells dank eines entstehenden Unterdrucks. Hierin lagern sich Kerationozyten ein. Diese gelangen dann durch die Retraktion in die Paukenhöhle, zumeist findet dieser Transport an der *Pars flaccida* statt, weil hier das Trommelfell zusammengehalten wird und die Spannung am niedrigsten erscheint.

(4) Hyperplasie der Basalzellschicht: Durch sporadisches papilläres Tiefenwachstum von Plattenepithelzellen an der Außenseite des Trommelfells entstehen gefüllte Epidermiszysten, die sich um Cholesteatome entwickeln.

(5) Eine Kombination von (3) und (4).

Chirurgische Klassifikation: (a) Beim Flaccida-Cholesteatom handelt es sich um ein epitympanales Cholesteatom als Retraktion oder Perforation mit Ausdehnung in das Epitympanon oder zum Aditus ad antrum mit möglichem Weiterwachstum bis in das Mastoid. (b) Das Sinus-Cholesteatom bildet sich ausgehend von einer Retraktion oder Perforation im hinteren oberen Trommelfellbereich mit Ausdehnung in die Region des Steigbügels, den Sinus tympani und das hintere

Mittelohr. Die Belüftungsblockade liegt meist in der Region des Hammergriffes. Die vordere Pauke ist frei. Das Mastoid i.d.R. nicht beteiligt. (c) Das tensa-Retraktionscholesteatom geht von der Pars tensa im Sinne eines Adhäsivprozesses aus oder von einer großen Perforation mit möglicher Ausdehnung in die Tubenöffnung und das Epitympanon. (d) Eine Sonderform ist die ‚Epidermosis‘, eine Situation bei der Epithel flächig auf die Rückseite des Trommelfells aufwächst. Das Epithel wächst dann wie beim randständigen Defekt unmittelbar auf den Knochen auf. Die Besonderheit besteht in flächenhaftem Wachstum.

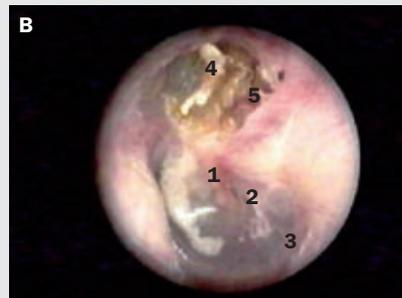
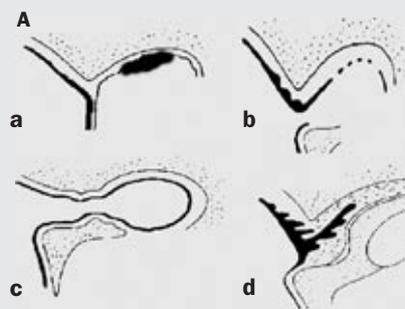


Abb. Exkurs 1: (A) Schematische Darstellung der unterschiedlichen Entstehungstheorien des erworbenen Cholesteatoms (a) Metaplasietheorie, (b) Immigrationstheorie, (c) Retraktionstaschentheorie, (d) Basalzellhyperplasietheorie. (B) Chirurgische Cholesteatom-Klassifikation nach Tos: a) Flaccida-Cholesteatom (4) b) Sinus-Cholesteatom (zwischen 2 und 3) c) Tensa-Retraktionscholesteatom (2). 1 Hammergriff 2 Pars tensa 3 Annulus 4 Cholesteatommatrix 5 Retraktionsrand.

Wegen seiner deutlich geringeren Häufigkeit werden wir mit ‚Cholesteatom‘ im Folgenden die erworbene Form meinen, es sei denn, es wird etwas anderes erwähnt.

Beide Formen können anhand ihrer Telomerlänge mittels molekularbiologischer Verfahren unterschieden werden: Die Telomeraseaktivität in den Zellen des kongenitalen Cholesteatom ist gering und so erscheinen die Telomere verkürzt, während bei Zellen der erworbenen Cholesteatome die Länge der Telomere nahezu identisch ist mit den Zellen der Gehörgangshaut.

Tos nahm 1993 eine neuere Klassifikation von Cholesteatomen vor, wobei er sich mehr nach der Lokalisation des Prozesses und ihrer chirurgischen Klassifikation richtete. Das Attic-Cholesteatom definiert er als eine unübersichtliche Retraktion der *Pars flaccida* (dünner Teil des Trommelfells), die sich in Attic (Dachboden) oder Aditus (Zugang) und womöglich auch in Antrum (Ausbuchtung), Mastoid (Warzenfortsatz) oder Mittelohrraum ausdehnt. Das Sinus-Cholesteatom bezeichnet eine posterior-superior gelegene Retraktion oder Perforation der Pars tensa, die sich in den *Sinus tympanicus*, die posterioren Anteile des Tympanons oder noch weiter ausdehnt. Unter dem Tensa-Cholesteatom versteht man eine Retraktion oder Adhäsion der gesamten Pars tensa (straffer Teil des Trommelfells), die tympanale Öffnung der Eustachischen Röhre mitbetreffend. Das Tensa-Cholesteatom kann allerdings auch noch weiter in den Attic-Raum vordringen (Exkurs1).

Klinisch manifestiert sich das Bild einer chronischen Mittelohrentzündung in der Regel mit einer zunehmenden Schallleitungsschwerhörigkeit. Zumeist geht die Entzündung einher mit einer chronischen Knochenerosion. Diese führt – so sie ohne weitere Behandlung bleibt – zu einer Aktivierung von Osteoklasten und somit sukzessive zum Verlust einzelner beziehungsweise aller Gehörknöchelchen und in letzter Konsequenz zu Verlusten des Gehörs (Abb.1A). Das Mittelohr (Abb.1B) besitzt die kritischste Struktur-Funktions-Beziehung im menschlichen Körper: Der Verlust von 1 mg Knochen der Gehörknöchelkette kann zu 50% Funktionsverlust beim Höreindruck führen. Der Hammer wiegt beim Menschen 23 mg, der Amboss 27 mg und der Steigbügel 2,5 mg (Gewichte können leicht variieren). Die Gehörknöchelchen sind untereinander gelenkig verbunden, über einen Bandapparat in der Höhle des Mittelohrs befestigt und werden in ihrer Gesamtheit von der Schleimhaut des Mittelohrs überzogen.

Die Patienten mit Cholesteatomen können auch weitere Komplikationen wie Druckge-

bei den meisten Patienten in deren früher Kindheit hinter intaktem Trommelfell im Bereich des vorderen oberen Quadranten (Mesotympanum). Es ist selten (1-3% aller Mittelohr-Cholesteatome) und wurde erstmals von Derlacki und Clemis 1965 beschrieben. Das erworbene (*acquired*) Cholesteatom tritt in der Regel bei Erwachsenen im Bereich des hinteren oberen Quadranten

des Trommelfells mit einer Perforation im Bereich der *Pars flaccida* (Shrapnellmembran) auf. Kongenitale Cholesteatome sind nicht nur selten, sondern müssen auch folgenden Kriterien standhalten: I) intaktes Trommelfell, II) keine vorangegangenen Operationen oder Traumen am Ohr, III) reizlose Mittelohrschleimhaut, IV) keine rezidivierenden Mittelohrentzündungen.

fühl im Ohr, Tinnitus, Ertaubung, Schwindel, Meningitis oder einen Hirnabszess erleiden, sobald eine akute Komplikation eintritt (Abb. 2C). Somit ist eine Entfernung per Operation nötig (Abb. 2D).

Ohrmikroskopisch können Cholesteatome sehr unterschiedlich in Erscheinung treten: Die Bandbreite reicht von einer weißlichen „Perle“ (Abb. 2A), die durch das intakte Trommelfell hindurchschimmert im Falle eines primären Cholesteatoms über unübersichtliche Retraktionstaschen bis hin zu schuppig belegten randständigen Trommelfellperforationen (Abb. 2B). Sekundäre Cholesteatome gehen in der Regel mit einer schmierig-eitrigen, fötiden Otorrhoe einher.

Wie bildet sich ein Cholesteatom?

Cholesteatome entstehen durch die Migration von Plattenepithelzellen in das Mittelohr (*Cavum tympani*, Paukenhöhle). Diese unter normalen Bedingungen sterile Paukenhöhle ist im normalen und gesunden menschlichen Ohr von einem einschichtigen platten bis

kubischen respiratorischen Epithel ausgekleidet. Gelangt (verhornendes) Plattenepithel (aus dem äußeren Gehörgang, z.B. durch Metaplasie oder durch Versprengung embryonaler Mesenchymreste – siehe Exkurs 1) in den Mittelohrraum, so beginnen die Zellen aus noch ungeklärten Gründen unkontrolliert zu wachsen. Die nun entstandene „Perle“ aus zwiebelschalentartig angeordneten verhornenden Plattenepithelzellen wächst weiter und bildet die Cholesteatommatrix. Diese wird von der Cholesteatomperimatrix unterschieden, die durch das subepitheliale Bindegewebe gebildet wird (Abbildung 2 E).

Im Bereich der Perimatrix kommt es zu einer chronisch inflammatorischen Reaktion. Im Rahmen dieser Entzündung kann es zum osteoklastären Abbau insbesondere der Gehörknöchelchen und der angrenzenden Felsenbeinstrukturen kommen.

Es gibt einige Theorien für die Entwicklung des kongenitalen Cholesteatoms: die Migration von Epithelzellen durch das intakte Trommelfell, die Metaplasietheorie, embryonale Keimversprengung sowie persistierende Epidermoid - Formationen.

Bei erworbenen Cholesteatomen ist häufig das Einwachsen von Plattenepithel durch einen primären Defekt oder aus nicht mehr selbstreinigenden Retraktionstaschen zu beobachten. Als Entstehungstheorien werden hierbei die Metaplasietheorie, die Immigration von Plattenepithel durch einen randständigen Trommelfelldefekt, die Retraktionstaschentheorie, die Hyperplasie der Basalzellschicht oder eine Kombination von Retraktion und Hyperplasie angegeben (siehe Exkurs 1).

Die Frage ist aber, wie entsteht eine solche Einwanderung und Wucherung von Plattenepithelzellen ursprünglich?

Wo und wann entstehen Cholesteatome im Mittelohr initial?

Beginnen wir erneut einen kurzen historischen Abschnitt und leiten dann zu aktuellen Arbeiten an den Thesen zur Entwicklung von Cholesteatomen über. Teed beobachtete 1936 epidermale Zellen mit Verhornungen und Abschilferungen im hinteren oberen Pol der Paukenhöhle

Leadership

International research and engineering teams guarantee creativity and precision for HEKA instruments and software.

www.heka.com

HEKA Elektronik
Dr. Schulze GmbH
Wiesenstraße 71
D-67466 Lambrecht/Pfalz
Germany
phone +49 (0) 63 25 / 95 53-0
fax +49 (0) 63 25 / 95 53-50
eMail sales@heka.com

HEKA Electronics Inc.
47 Keddy Bridge Road
R.R. #2
Mahone Bay, NS B0J 2E0
Canada
phone +1 902 624 0606
fax +1 902 624 0310
eMail nasales@heka.com

HEKA Instruments Inc.
2128 Bellmore Avenue
Bellmore, New York 11710-5606
USA
phone +1 516 882 1155
fax +1 516 467 3125
eMail ussales@heka.com

The collage consists of four distinct images. Top left: A black and white photograph of a man in a white lab coat looking through a microscope. Top right: A photograph of a HEKA electronic instrument rack with several modules. Bottom left: A screenshot of the EPC9 Amplifier software interface, showing various control parameters like Gain (5.0 mV/pA), V membrane (0.0 mV), and Test Pulse settings. Bottom right: A fluorescence micrograph showing a complex, branching structure, likely a neuron or a similar biological cell.

HEKA provides the finest instruments today to achieve the needed progress of tomorrow...

- patch clamp amplifiers
- multi-channel stimulation/acquisition patch clamp systems
- potentiostats/galvanostats
- acquisition interfaces
- software for acquisition and analysis
- pipette pullers
- micromanipulators
- complete patch clamp set-ups
- scanning electrochemical microscopes

HEKA

Electrophysiology

Electrochemistry



bei einem vier Monate alten Föten und vermutete, dass die Persistenz dieser Zellen ein Cholesteatom verursachen könnte. Nach fünf Jahrzehnten sehr geringer Forschungsaktivität auf dem Gebiet der Cholesteatomentstehung wurden diese Epidermoid-Formationen (EFs) von Leslie Michaels und Mitarbeitern aus London als „Zellinseln von verhornendem Plattenepithel“ bei 42% ihrer untersuchten Feten 1982 erneut beschrieben. Die EFs wurden regelmäßig im anterosuperior lateralen Abschnitt der Seitenwand der Paukenhöhle kurz vor dem Ansatz der Membrana tympani (Trommelfell) nachgewiesen. Auf bislang ungeklärte Weise verschwindet dieses Gewebe während des ersten Lebensjahres. Diese EFs entstehen in der 16ten Schwangerschaftswoche und entspringen der Gehörgangshaut-Epidermis. Bei Ausbleiben der Rückbildung könnten die EFs als Ausgangspunkt zur Entwicklung von kongenitalen Cholesteatomen angenommen werden. Eine EF besteht aus einer verdickten Lage geschichteter und platter Zellen und geht teilweise mit Keratinbildung einher. Die überwiegende Anzahl der EFs weist jedoch keine Verhornungstendenz auf. Immunhistochemisch konnte diese Arbeitsgruppe in London zwei Jahrzehnte später ein dem der äußeren Gehörgangshaut vergleichbares Verteilungsmuster von Zytokeratinen nachweisen (zu Zytokeratinen siehe Exkurs 2).

Ein identisches Muster verschiedener Zytokeratine ließ sich auch von unserer Arbeitsgruppe bei Untersuchungen zur Expression von Proteinen an Geweben von kongenitalen und erworbenen Cholesteatomen nachweisen, andeutend, dass beide Formen des Cholesteatoms von einem gemeinsamen Ursprung stammen könnten (Olzewska et al. 2005). Insbesondere die Färbung mit Antikörpern gegen CK10 und CK34βE12 (erkennt CK1, 5, 10, 14) im keratinisierenden Epithel deutet auch auf eine erhöhte Wachstumskapazität in beiden Cholesteatom-Klassen hin. Noch sind Untersuchungen nicht möglich, zu beobachten, ob ein solch etwa EGFP-markiertes EF-Areal sich später im adulten (Cholesteatom) nachweisen lassen würde – es fehlt an einem geeigneten Tiermodell, sehr interessant wäre es, die Gründe zu erfahren, warum die EFs bei etwas mehr als der Hälfte der untersuchten Patienten wieder verschwinden und bei der anderen nicht.

Einige Jahre zuvor hatten wir bereits mit Studien zum Expressionmuster der Zytokeratine in Keratinozyten begonnen. Interessanterweise stellten wir fest, dass

Exkurs 2

Zytokeratine

Vor der Verhornung sowie allgemein in Epithelien der Wirbeltiere und anderer Tiergruppen liegen Zytokeratine (oder α -Keratine) in Form von lose organisierten Keratinfilamenten vor. Diese gehören zu den Intermediärfilamenten, welche zusammen mit den Mikrotubuli und Mikrofilamenten (F-Aktine) das Zytoskelett der eukaryotischen Zellen bilden. Derzeit sind 20 verschiedene Cytokeratin-Proteine bekannt (siehe unten), deren Molekülmasse zwischen 40 und 68 kDa liegt und die die größte Klasse der Intermediärfilamente darstellen. Sie weisen isoelektrische Punkte zwischen pH 5 und pH 8 auf und treten in epithelialen Zellen meist paarweise auf. CK1-CK8 werden zur neutral-basischen Typ-A Subfamilie

gezählt, während CK9-CK20 die saure Typ-B Subfamilie darstellen. Diese bilden paarweise in den Intermediärfilamenten einen Heterodimer-Komplex bestehend aus einem Typ-A - und einem Typ-B-Zytokeratin. Die Zytokeratine besitzen eine stabartige, α -helikale Zentraldomäne mit hypervariablen Regionen, die reich an Serin- und Glycin-Sequenzen sind. Saure Zytokeratine mit relativ kleinem Molekulargewicht binden sich an einen basischen mit relativ größerem Gewicht (etwa 7-10kDa Unterschied).

Das Verteilungsmuster dieser Komplexe unterscheidet sich in den einzelnen epithelialen Zellen erheblich, sodass mit einem Antikörpernachweis gegen die Subtypen CK1-CK20 die Herkunft dieser Zellen eingegrenzt werden kann. Dies macht man sich in der Medizin in der pathologischen Diagnostik zunutze, um die Herkunft von Tumormetastasen bestimmen zu können.

Typ-A (neutral-basisch)	Typ-B (sauer)	Vorkommen
CK 1, 2	CK 9, 10	mehrschichtig-verhornendes Epithel (Epidermis)
CK 3	CK 12	Hornhaut (Cornea)
CK 4	CK 13	mehrschichtig-unverhorntes Epithel
CK 5	CK 14, CK15	Basalzellen komplexer Epithelien, Myoepithelzellen
CK 6	CK 16, CK17	mehrschichtig-unverhorntes Plattenepithel, Proliferation
CK 7	CK 19	einschichtiges Epithel, luminale Drüsenzellen
CK 8	CK 18, CK20	einschichtiges Epithel, luminale Drüsenzellen

diese hornbildenden Zellen, die die Haut zu mehr als 90% bilden, nicht auf Signale vom entzündeten Stroma reagieren (s.u.). Wenn wir nun ihr Zytokeratin-Expressionsmuster zu benachbarten Ohrephelien (Mittelohrschleimhaut, Gehörgangshaut, Drüsenepithel) verglichen, so zeigte sich in der Kombination der Antikörper gegen CK4, CK34βE12, CK10, CK14 ein spezifisches Muster für die Hyperproliferation der Cholesteatom-Epithelien, nicht aber für die anderen Normalgewebe.

Inspiziert von den damaligen Untersuchungen im Großhaderner HNO-Zentrum bei Prof. Kastenmeier und Dr. Bujia bezüglich des Immunsystems bei Cholesteatom-Patienten wollten wir wissen, wie es zum hyperproliferativen Wachstums- und veränderten Differenzierungsverhalten der Keratinozyten gekommen sein könnte. Hierzu untersuchten wir mittels immunhistochemischer Methoden die Mukosa des Mittelohres. Im normalen Ohr ist die Mittelohrpauke von einer sekretierten kubischen oder zylindrischen Mukosa ausgekleidet, worunter sich eine dünne Schicht Mesenchym befindet. Diese Mukosa wird

bei Anwesenheit eines Cholesteatoms durch einwanderndes keratinisierendes Plattenepithel ersetzt. Die Mukosa bleibt als zystische Formation im Stroma des Cholesteatoms präsent oder zur wandernden Front des Cholesteatom-Epitheliums anhängend.

Welche Faktoren beeinflussen Cholesteatome im Mittelohr im Wesentlichen?

Wir fanden in immunhistochemischen Untersuchungen und *insitu* Hybridisierungen heraus, dass sich hohe Konzentrationen an Lymphozyten und Makrophagen im Stroma des reaktiven Cholesteatom-Epitheliums und der nichtreaktiven Mittelohr-Mukosa befanden. Diese Immunzellen exprimierten IL-1, TGF- α , EGF und EGFR. Der Rezeptor wurde im Cholesteatom-Epithelium hochreguliert, sodass wir die These vom autokrinen Loop bestätigt bekamen: Die Keratinozyten sind aktiviert und werden durch die Faktoren proliferiert und migriert. Des Weiteren beobachteten wir eine Ausdehnung der Expression von EGFR von

basalen Zellschichten (regelrechte Gehörgangshaut) hin zu den suprabasalen (Cholesteatom). Zudem war der Anteil der EGFR-mRNA exprimierenden Zellen in epithelialen Zellen von 10% auf 75% gestiegen.

Hinzu kommt, dass eine verminderte Konzentration des IL-1-Rezeptorantagonisten (IL-1R-A) zu einer gesteigerten biologischen Aktivität des vorhandenen IL-1 führt (Bujia et al. 1996). Die Mukosa hingegen zeigte im selben Experiment keine Reaktion auf die polyklonalen Antikörper gegen EGFR. Mittelohr-Mukosa entstammt phylogenetisch vom Endoderm, das Plattenepithel hingegen ist von ektodermalen Ursprung.

Die Keratinozyten der Mittelohr-Mukosa scheinen also nicht auf Stimuli des entzündeten Stroma-Gewebes zu reagieren. Um den Unterschied im Verhalten zwischen Mukosa und Plattenepithel unter Einfluss des entzündeten Bindegewebes zu verstehen, mussten wir weitere Experimente starten.

Wie kommt es zur erhöhten Proliferation in den Cholesteatomen?

Wir wiesen nach, dass die aktive Zellvermehrungsrate bei Keratinozyten aus Cholesteatomen signifikant erhöht ist (Sudhoff et al. 1995). Unsere Untersuchungen mithilfe des Zellzyklus-assoziierten nukleären Antigens (MIB1) belegten nicht nur, dass der Proliferationsindex (Quotient MIB1-positiver Zellen zur gesamten Anzahl der Zellen) für Keratinozyten in Cholesteatomen (17,4%) um 2,3-fach höher liegt als in Keratinozyten der normalen Gehörgangshaut (7,6%), sondern auch erstmals, dass es offenkundig verschiedene Proliferationsstadien des Cholesteatomgewebes geben sollte (hierfür spricht der weit reichende Index von 9,5% bis hin zu 41% der untersuchten Proben als auch die Beobachtung deutlich unterschiedlicher Quotienten in den verschiedenen Arealen desselben Cholesteatomgewebes). Die Durchschnittszahl MIB1-positiver Keratinozyten stieg mit der Dicke des Epitheliums. Jesus Bujia erklärte sich dieses Verhalten folgendermaßen: Entweder würde sich eine Störung der Keratinozyten-Proliferation ereignen, die dann von einer autokrinen Wachstumsstimulation des Cholesteatom-Epitheliums gestützt würde; oder die Entzündung führt zu einem Anstieg der Erneuerung von Epithelium, was sich dann in den vielen MIB1-positiven Keratinozyten in der basalen Zellschicht absehen ließe.

Steinbach versuchte induzierbare Tiermodelle für das Cholesteatome zu entwickeln. Bei seinen Versuchen an Kaninchen erkannte er, dass Cholesteatome anfangs Plattenepithelkegel entwickeln, die später in subepitheliales Bindegewebe abgetrennt werden. Auch bei unseren humanen Proben konnten wir diese Wachstumskegel mit deutlich angestiegener Immunfärbung für MIB1 in den Keratinozyten beobachten. Insbesondere offenbart das subepitheliale Bindegewebe eine Serie lokaler, verschieden starker Proliferationsaktivitäten.

Die Ki-67-Färbung, die MIB1 verursacht, ist in normaler menschlicher Haut in den Kernen und dem Zytoplasma der basalen Keratinozyten zu finden. Die Anzahl Ki-67-positiver Zellen steigt in den basalen Schichten von Cholesteatomgeweben an, zudem sind zahlreiche Zellen in den suprabasalen Schichten (verglichen mit Haut auf Faktor 1,3 bzw. 1,2 bei mit Bakterien infizierten und nicht-infizierten Cholesteatomen) zu finden.

Mit einem weiteren Proliferationsmarker konnte interessanterweise keine direkte Korrelation zu Ki-67 hergestellt werden. Das weite Bild der Heterogenität der Anfärbung von

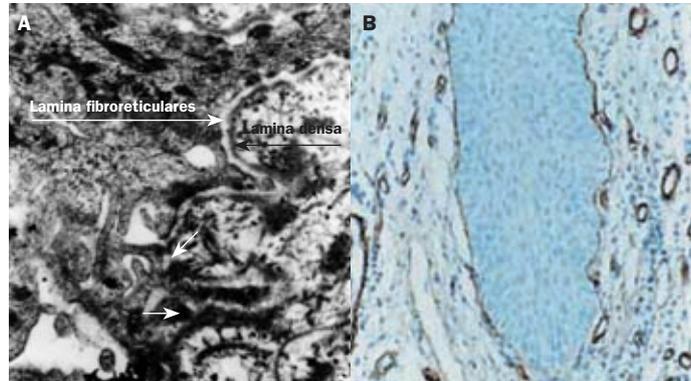
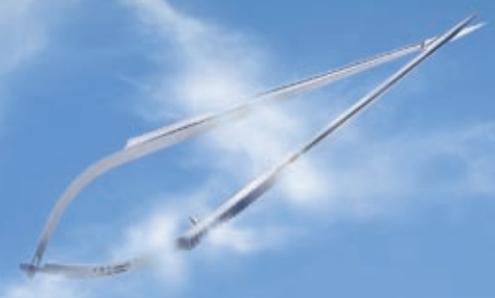


Abb. 3: (A) Elektronenmikroskopische Aufnahme der Lamina fibroreticularis (Teil der Dermis) und Lamina densa (Teil der Basalmembran), Magnifikation x2000. (B) Fokale Diskontinuität der Basalmembran des Mittelohr-Cholesteatoms an der Spitze des papillären Tiefenwachstums und vermehrte Neovaskularisation (Immunhistochemie, Avidin-Biotin-Technik, DAB, x200; Sudhoff et al., 2000).

Zellen mit dem proliferierenden Zellkern Antigen (PCNA) in den verschiedensten Schichten des Cholesteatoms ist bei PCNA-positiven Zellen ähnlich wie bei Färbung mit Ki-67, aber nicht identisch. Der Unterschied lässt sich auf die Beobachtung stützen, dass PCNA-Fär-

F · S · T[®]
FINE SCIENCE TOOLS

FINE SURGICAL INSTRUMENTS FOR RESEARCH™



The Elements of Discovery

Scissors • Needle Holders • Forceps • Retractors • Clamps
Rongeurs • Probes • Scalpels • Surgical & Laboratory Accessories
Student Quality Instruments

Request a catalog at finescience.de
or call +49 (0) 62 21 90 50 50



bung nur an Nuclei möglich ist, die sich in der S-Phase befinden, während mit Ki-67 auch Zellen, die sich in M-, G2- und später G1-Phasen befinden, markiert werden. Im normalen Gewebe wurden PCNA-positive Zellen nahe der Basallamina gefunden, während im Cholesteatom-Epithelium die suprabasalen Zellschichten angefärbt wurden. Dies kann als ein Hinweis gedeutet werden, dass vermehrte Zellteilung der oberen Schichten der Epidermis für die ansteigende Dicke des Cholesteatom-Epithels verantwortlich ist. Interessanterweise ist die PCNA-Färbung unterschiedlich intensiv in verschiedenen Arealen und hängt nicht von der Dicke des Epitheliums ab. Auch gab es keinen Unterschied zwischen infizierten und nicht-infizierten Cholesteatomen bezüglich der Anfärbung mit PCNA zu beobachten, sodass das hyperproliferative Verhalten des Epitheliums bei Cholesteatomen möglicherweise von Zytokinen und Wachstumsfaktoren verursacht wird, die aus immunologisch aktiven Zellen des Bindegewebes freigesetzt werden. Wer oder was aber sorgt für die Aktivierung dieser Immunzellen? Schauen wir uns hierzu die morphologischen Veränderungen des ursprünglichen Plattenepithels an.

Was verändert sich morphologisch im Cholesteatom durch das Wachstum?

Die Cholesteatoma-Matrix weist eine Neigung zum aktiven papillären Tiefenwachstum in das subepitheliale Bindegewebe auf. Zudem zeichnet sich die Matrix als hyperproliferierendes Epithelgewebe aus und weist eine inhomogene Verteilung der heranreifenden Keratinozyten innerhalb der Matrix auf.

In der Perimatrix finden wir neben den deutlichen Parallelen zu den Reaktions-

mustern im Rahmen der Wundheilung auch gesteigerte Expression der Matrixmetalloproteinasen MMP1, 2 und 3 sowie verminderte Expression der Inhibitoren TIMPs. Somit ist die proteolytische Aktivität in der Perimatrix deutlich erhöht.

Ein Vergleich der Immunreaktivitäten für Kollagen Typ IV und Typ VII sowie Fibronectin in der Basallamina der Haut zeigte uns, dass die Kollagen-Reaktivitäten in Cholesteatomgeweben verschwunden waren, während Fibronectin in der extrinsischen Basallamina und dem subepithelialen Bindegewebe stark hochreguliert zu sein scheint. Ultrastrukturelle Beobachtungen zeigten uns, dass die Basallamina der Cholesteatome denen der Haut ähneln, es in den *Lamina fibroreticularis* und *densa* auffällige Veränderungen gibt (Abbildung 3A). Diese Beobachtungen führten uns zu der Überlegung, dass Cholesteatome eine Erkrankung mit veränderten Zellmatrixinteraktionen darstellen, die an die Reepithelisierung bei Wundungen erinnern.

Auch wollen die proliferierenden Zellen versorgt und genährt werden: In einer Zusammenarbeit mit Allen Ryan aus La Jolla zählten wir die Blutgefäße in den Geweben und erkannten, dass ein 3,2-facher (im Vergleich zur Mittelohrschleimhaut) bzw. 4-facher (im Vergleich zur regelrechten Gehörgangshaut) Anstieg der kapillaren Gefäße in der Perimatrix des Cholesteatoms zu beobachten war. Der Grad der Neovaskularisation – nachgewiesen durch die Expressionsmuster von FGF2, VEGF, TGF- β 1 und - α – stieg ebenso um das 4,3-fache bzw. 2-fache an. (Abb. 3B; Sudhoff et al. 2000).

In einer weiteren Arbeit wurde gezeigt, dass die Immunreaktivität für Kollagen IV (netzbildendes Kollagen) bei normaler Haut und Mittelohrschleimhaut im

Bereich des BMZ (Basalmembranzone) kontinuierlich ist, hingegen bei Cholesteatomgeweben diese gänzlich fehlt oder stark unterbrochen erscheint. Kollagen VII (Verankerungsfibrillen) erscheint hingegen weiter konstant exprimiert zu werden. Zurzeit sind 28 verschiedene Kollagentypen bekannt (Typ I bis XXVIII). Alle Kollagene haben gemein, dass sie aus drei Polypeptidketten aufgebaut sind, die man als Kollagen-Helices bezeichnet und die in Form einer Tripelhelix umeinander gewunden sind.

Die Immunreaktivität für Fibronectin (extrazelluläres Glykoprotein, das in vielen physiologischen Abläufen, unter anderem in der Gewebsreparatur, der Embryogenese, der Hämostase sowie in der Migration und Adhäsion von Zellen eine wichtige Rolle spielt) hingegen ist bei Cholesteatomen (äußere BMZ, subepitheliales Bindegewebe) stärker ausgeprägt. Die Ultrastruktur der Cholesteatome erscheint wie eine Erkrankung mit zerstörten Zellmatrix-Interaktionen wie etwa bei der Re-Epithelisierung nach Wundung der Haut. Es sind insbesondere in der *Lamina fibroreticularis* (Teil der Dermis) und *Lamina densa* (Teil der BMZ) starke Veränderungen sichtbar.

Albino und Kollegen zeigten, dass auch bei Mastzellen ein drei- bis siebenfacher Anstieg in kongenitalen und erworbenen Cholesteatomen verglichen zu Normalgewebe (Trommelfell, Gehörgangshaut, postaurikuläre Haut) nachweisbar ist. 19-34% dieser Zellen wurden in den suprabasalen Schichten des Plattenepithel gefunden, was man auch bei stark entzündeten, nicht aber bei leicht entzündeten Trommelfellen vorfindet. Die Mastzellen sind insbesondere bei Entzündungen, bei der Abwehr von Bakterien, bei der Induktion von

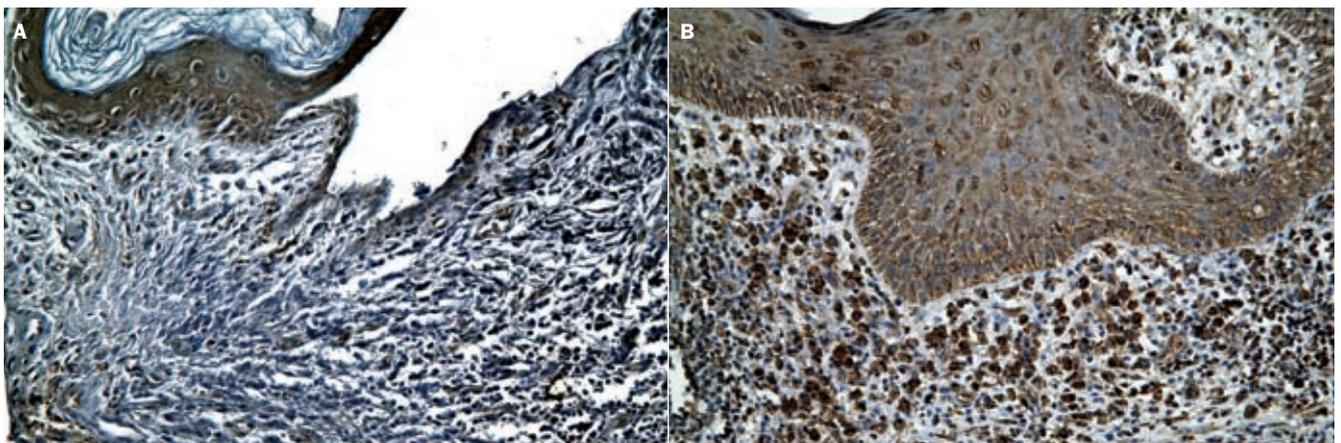


Abb. 4: (A) Nachweis verschiedener HDPs im Cholesteatomgewebe. Überexpression von HBD3. (B) und LL37 in der Perimatrix des Cholesteatoms (Immunhistochemie, Avidin-Biotin-Technik, DAB, x100; Fränzer et al., in preparation)

Gewebeerneuerung in der Dermis involviert und verstärken die Neuroangiogenese.

Aus dieser Beobachtung und dem Wissen, dass Mastzellen vielfältige Faktoren (z.B. bFGF, IL-1,-3,-4,-5,-6,-8, GM-CSF, IFN- γ , TNF α , TGF β 1, macrophage inflammatory protein 1a und RANTES) sezernieren, können wir zwei Schlüsse ziehen. Möglicherweise ist die Induktion des Cholesteatoms das Ergebnis eines defekten Wundheilungsprozesses mit wesentlichen Veränderungen innerhalb des Cholesteatom-Epitheliums. Oder die Induktion geschieht durch eine pathologische Kollision zwischen der Entzündungsantwort, dem normalen Mittelohr-epithelium und einer akuten bakteriellen Infektion.

Weil im trockenen Gehörgang des menschlichen Ohrs von Kaukasierern mit geringen Mengen an Bakterien und Entzündungsreaktionen keine Erhöhungen der Menge an Mastzellen beobachtbar ist, muss man davon ausgehen, dass Wundheilungen ohne Entzündungsantworten nicht ausreichen, um die Migration von Mastzellen zu induzieren. Eine ähnliche Beobachtung wurde auch bei der Otitis media gemacht, nämlich, dass Mastzellen die innate Immunabwehr zur Verteidigung gegen bakterielle Infektionen im Mittelohr aktivieren und vermitteln.

Andererseits dürfte auch die erworbene Immunabwehr involviert sein, als vor Kurzem eine polnische Arbeitsgruppe zeigen konnte, dass die Toll-like - Rezeptoren TLR-2,-3 und -4 im Epithelium des Cholesteatoms (und zum Teil auch in der Perimatrix) stärker exprimiert werden als in der Gehörgangshaut.

Wenden wir uns hin zur mikrobiellen und fungidalen Lebenswelt im Gehörgang – das Mittelohr selbst ist unter normalen Umständen keimfrei.

Könnten Bakterien im Gehörgang eine Ursache für die Entwicklung von Cholesteatomen darstellen?

Unter normalen Bedingungen leben *Staphylococcus epidermidis*, *Corynebacterium spp.*, *Micrococcus spp.*, alpha-hämolytische und nichthämolytische Streptococci, sowie kleine Anzahlen an *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus aureus* im menschlichen Gehörgang. Im gesunden Ohr sind das Plattenepithel des äußeren Gehörgangs und das Schleimhautepithel des Mittelohrs durch das Trommelfell getrennt. Die häufigsten Erreger der Mittelohrentzündung, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* und *Moraxella catarrhalis* werden unter normalen Umständen nicht im Gehörgang gefunden. *S. aureus* und *P. aeruginosa* werden in chronisch entzündeten, laufenden Ohren gefunden.

Die regelrechte Mittelohrschleimhaut des Menschen ist wenige Mikrometer dick und enthält sehr wenige inflammatorische Zellen. In Mittelohrentzündungen vergrößert sich diese Zellschicht auf einige Hundert Mikrometer, enthält zahlreiche inflammatorische Zellen und neue Mikrogefäße. In humanen Cholesteatomen werden erhöhte Konzentrationen von Mastzellen gefunden. Diese Zellen sezernieren neben Zytokinen in großen Mengen Proteinasen wie Trypsin, Chymase, Carboxypeptidase und Cathepsin G. Die Granula der Mastzellen enthalten mitogene und angiogenetische Faktoren wie bFGF, IL-6, -8, die sich für die Neovaskularisation im Cholesteatomgewebe mitverantwortlich zeichnen.

Das flüssige Sekret der humanen apokrinen Drüsen erscheint zunächst steril auf der Hautoberfläche. Es enthält Pheromone und Komponenten der angeborenen Immunabwehr wie Laktoferrin, Lysozym und Defensine. Die Reifung der sekretorischen Elementen

im Tubotympanum dauert bei Mäusen bis zum postnatalen Tag 21 an. Das Cerumen scheint bei der Abwehr von bakteriellen Infektionen (z. B. *Staphylococcus epidermidis*, *Corynebacterium spp.*, *Candida albicans*) im äußeren Gehörgang eine wichtige Rolle zu spielen.

Unsere neuen Untersuchungen beziehen sich auf die Präsenz von sogenannten anti-mikrobiellen Peptiden (Abbildung 4). Diese sind auch Bestandteil des Cerumen. Wir wollen nun klären, welchen Beitrag diese zur Abwehr der bakteriellen Infektion und der hieraus möglichen Verursachung von Cholesteatomen leisten. Sie besitzen als wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems breite antimikrobielle und zusätzlich fungizide und antivirale Potenz. Einigen der bei Mensch und Tier bislang etwa 900 bekannten Peptiden werden weitere Eigenschaften wie Bakteriolyse, Opsonierung, Immunpotenzierung und Anti-Tumorkativitäten zugeschrieben. Neben diesen Charakteristika verbinden und modulieren z.B. die β -Defensine auch die angeborene mit der erworbenen Immunantwort durch ihre Funktion als Chemoattraktoren für unreife dendritische Zellen, T-Lymphozyten und Mastzellen.

Ein weiteres Problem mag das Vorhandensein von bakteriell infizierten und nicht-bakteriell infizierten Cholesteatomen darstellen. Die Rolle einer Biofilminfektion beim Cholesteatom muss in der Zukunft geklärt werden. Biofilmbildende Bakterien, wie *Pseudomonas aeruginosa*, die innerhalb einer extrazellulären polymeren Matrix eingeschlossen sind, können sich auf der Grenzfläche des desquamierten Keratins ansammeln. Biofilm-Bakterien sind gegen das menschliche Immunsystem weniger anfällig und infolgedessen kann eine Biofilm-assoziierte Infektion über

World Precision Instruments

Anaesthesia
Blood Pressure
Stereotaxics
Behaviour
Biosensing
Electrophysiology

Neuroscience Solutions from World Precision Instruments

Product Focus
The WPI Stereotaxic Frames are now available with the Neurostar StereoDrive system. The StereoDrive allows for motorized, computer-controlled stereotaxic positioning in all three orthogonal axes for electrophysiology and stereotaxic injections. Now you can toss the reference book and atlas. With StereoDrive, coordinates are at your fingertips.

for more information please visit
www.wpi-europe.com

WPI
World Precision Instruments Germany GmbH
Zossener Str. 55-58 D-10961 Berlin, Germany
Tel. +49 (0)30 6188845 Fax +49 (0)30 6188670
E-mail wptide@wpi-europe.com



einen längeren Zeitraum bestehen und zur Pathogenese des Mittelohrcholesteatoms beitragen.

Fazit und Perspektiven

Ein Cholesteatom kann man als eine fehlgeleitete Wundheilung der äußeren Gehörgangshaut betrachten. An humanen Felsenbeinstudien konnte gezeigt werden, dass auch ehemalige Retraktionen bei intaktem Trommelfell Platteneithelnestern an ihren ehemaligen Anheftungsstellen belassen können und zu Cholesteatomen führen können. Wir konzentrieren uns derzeit auf die Untersuchung bakterieller Ursachen aufgrund möglicher Defekte der angeborenen Immunabwehr. Diese innate Abwehr ist zu einem großen Teil induzierbar, was somit zur Entwicklung von Medikamenten führen könnte. Aktuell gibt es für Cholesteatome als Behandlungsmethode nur die Entfernung durch Operationen.

Literatur

- Müller, J. (1838): *Über den feineren Bau und die Formen der krankhaften Geschwülste*. Berlin: G Reimer, 50.
- Bujia, J., Sudhoff, H., Holly, A., Hildmann, H. und Kastenbauer, E. (1996): Immunohistoche-

- mical detection of proliferating cell nuclear antigen in middle ear cholesteatoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 253: 21-24.
- Sudhoff, H., Dazert, S., Gonzales, A.M., Borkowski, G., Park, S. Y., Baird, A., Hildmann, H. und Ryan, A.F. (2000): Angiogenesis and angiogenic growth factors in middle ear cholesteatoma. *Am. J.Otol*. 21: 793-798.
- Michaels, L. (1988): Origin of congenital cholesteatoma from a normally occurring epidermoid rest in the developing middle ear. *Int. J. Pediatric Otolaryngol*. 15: 51-65.
- Olszewska, E., Wagner, M., Bernal-Sprekelsen, M., Ebmeyer, J., Dazert, S., Hildmann, H. und Sudhoff, H. (2005): Etiopathogenesis of cholesteatoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 262: 731-736.
- Sudhoff, H., Bujia, J., Fissler-Eckhoff, A., Holly, A., Schulz-Flake, C. und Hildmann, H. (1995): Expression of a cell-cycle-associated nuclear antigen (MIB 1) in cholesteatoma and auditory meatal skin. *Laryngoscope*. 105: 1227-1231.

Eine vollständige Literaturliste kann bei den Autoren angefordert werden.

Kurzbiografien

Dr. Jürgen-Theodor Fränzer: Studium der Biologie an den Universitäten Bonn, Heidelberg und Galway (Irland). Promotion an der Universität Magdeburg, Postdoc

am House Ear Institute in Los Angeles, CA (USA), im Hörforschungszentrum Tübingen und in der HNO-Uniklinik Regensburg. Arbeitsgruppenleiter in der HNO-Klinik der Medizinischen Uni Innsbruck und seit 2008 im Klinikum Bielefeld.

Prof. Dr. Holger Sudhoff: Studium der Medizin an der Universität Bochum und der UCSD Medical School, San Diego (USA). Ausbildung zum Facharzt und Oberarzt am Uniklinikum Bochum (St. Elisabeth Krankenhaus). Fellowship in Skull Base Surgery (2006-2007) an der Cambridge University. Seit 2007 Direktor der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde am Klinikum Bielefeld.

Korrespondenzadresse

Jürgen-Theodor Fränzer und Holger Sudhoff
 Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde,
 Klinikum Bielefeld gem. GmbH
 Teutoburger Straße 50
 33604 Bielefeld
 Tel.: +49 521 5813301
 Fax: +49 521 5813399
 E-Mail: Juergen-Theodor.Fraenzer@gmx.net
 holger.sudhoff@klinikumbielefeld.de

Neues auf der NWG-Homepage



Es gibt ein paar Neurungen auf der Website der Neurowissenschaftlichen Gesellschaft. Zum einen ist nun unter der Überschrift „Publikationen und Informationsmaterial“ ein Punkt „Populärwissenschaftliche Vorträge“ zu finden. Diese Verzeichnis listet allgemeinverständliche neurowissenschaftliche Vorträge, die Mitglieder der Neurowissenschaftlichen Gesellschaft anbieten. Weitere Vorträge werden gern aufgenommen.

Zum anderen wurde ein Verzeichnis von „Fördermöglichkeiten“ in den Neurowissenschaften begonnen. Diese Aufstellung

listet Institutionen, die vorrangig oder unter anderem den wissenschaftlichen Nachwuchs in den Neurowissenschaften und die neurowissenschaftliche Forschung fördern. Sie erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit und soll weiter ausgebaut werden. Ergänzungen, Hinweise für weitere Einträge und Korrekturen sind jederzeit willkommen.

Bei dieser Gelegenheit möchten wir auch noch auf die Bilddatenbank auf der NWG-Website hinweisen. Sie ist ebenfalls unter „Publikationen und Informationsmaterial“ zu finden. Bisher enthält diese Datenbank nur Bilder, die in Neuroforum veröffentlicht wurden. Es können aber auch andere Bilder eingestellt werden. Falls Sie erklärende Schemata oder ästhetisch ansprechende Bilder aus Ihrer Arbeit haben, können Sie diese gern an die Geschäftsstelle für die Veröffentlichung in der Datenbank schicken. Die Bilder sollten von einer kurzen Legende und von bis zu drei Keywords für die Suchfunktion ergänzt werden.

Fehlende Mitgliederadressen

Von folgenden Mitgliedern fehlt uns die korrekte Anschrift:

- Bingmann, Prof. Dr. med. Dieter (vormals: Essen)
 Boyraz, Penar (vormals: Göttingen)
 Brust, Dr. Beatrix (vormals: Ludwigsburg)
 El-Meligi, Dr. Samir (vormals: Bochum)
 Jost, Britta (vormals: Bochum)
 Kunst, MSc Michael (vormals: Göttingen)
 Seiferth, Katharina (vormals: Berlin)
 Singec, Ilyas (vormals: Bethesda, USA)
 Spielmann-Emden, Eckhard (vormals: Göttingen)
 Sterr, Dr. Annette (vormals: Liverpool, UK,)

Für Hinweise sind wir dankbar.

Das neuronale Netzwerk der Inneren Uhr

Charlotte Helfrich-Förster

Zusammenfassung

Innere Uhren kontrollieren den Zeitablauf vieler wiederkehrender biologischer Prozesse. Geraten Innere Uhren beim Menschen aus dem Takt, führt dies zu Krankheiten, die von Schlafstörungen, Depressionen, dem metabolischen Syndrom bis hin zu Krebs reichen. Alle Tiere haben eine übergeordnete Innere Uhr im Gehirn. Diese besteht aus einem Netzwerk miteinander kommunizierender Neuronen. Individuelle Uhren-Neurone erzeugen molekulare Rhythmen in Gen-Transkription und Translation, die letztendlich zu rhythmischer neuronaler Aktivität führen. Durch neuronale Kommunikation synchronisieren sich die individuellen Rhythmen und sorgen für ein charakteristisches neuronales Aktivitätsmuster, das sich im rhythmischen Verhalten widerspiegelt. Dieses Aktivitätsmuster passt sich an unterschiedliche Umweltbedingungen (Jahreszeiten) an. Die Flexibilität der Inneren Uhr könnte auf unterschiedliche Funktionen individueller Uhren-Neurone im Netzwerk zurückzuführen sein. In den letzten Jahren hat sich die Taufliege *Drosophila* vom genetischen zum neuronalen Modellsystem für Innere Uhren entwickelt. In der kleinen Fliege kann die Uhr durch Genmanipulationen auf wenige Neuronen beschränkt werden, und dieser reduktionistische Ansatz hat geholfen, die Rolle einzelner Neuronen in der Inneren Uhr aufzuklären. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse scheinen allgemein zu gelten.

Abstract

The neuronal network of the endogenous clock

Endogenous clocks control the rhythm of many biological processes. Malfunction of endogenous clocks in humans can lead to various diseases as sleep disorders, depressions, the metabolic syndrome and cancer. All animals have a main clock in the brain. This clock comprises a network of clock neurons that communicate with each other. In each clock neuron, conserved clock genes and proteins interact in to generate a molecular oscillation. The molecular basis of this rhythm generation as well as the anatomy of the neuronal clock network is best investigated in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. In the little fly, clock genes can be shut down in specific clock neurons. Furthermore, specific clock neurons can be electrically silenced and the rhythmic behaviour of such manipulated flies can be studied. A flurry of recent studies has begun to identify the role of specific clock neurons in the clock network, and these findings are helping to understand the basic neuronal mechanisms of endogenous clocks.

Keywords: circadian clock; *Drosophila*; period; PDF; neuronal network

Einleitung

Innere Uhren passen Lebewesen an die physikalischen Rhythmen unserer Erde an. So gibt es biologische Jahresuhren, Monatsuhren sowie Tagesuhren. Allen Inneren Uhren ist gemeinsam, dass sie auch in Abwesenheit der physikalischen Rhythmen – auch als externe Zeitgeber bezeichnet – weiterlaufen, und zwar mit einer ihnen eigenen Geschwindigkeit, die in der Regel leicht vom externen Rhythmus abweicht. Am besten untersucht sind die Tagesuhren. Sie laufen mit einer endogenen Geschwindigkeit (= Periodenlänge) von

ungefähr 24 Stunden und werden deshalb auch als circadiane Uhren bezeichnet (aus dem lateinischen „circa“ und „dies“ (Tag)). Dieser Übersichtsartikel beschäftigt sich nur mit circadianen Uhren. Ein kurzer Abriss der Lehre über Innere Uhren (Chronobiologie) findet sich im Exkurs.

Lange Jahre war unbekannt, wie circadiane Rhythmen erzeugt werden. Der Durchbruch begann mit einem Screen nach Rhythmusmutanten, den Konopka und Benzer 1979 an der Taufliege *Drosophila melanogaster* durchführten. Sie erzeugten durch die Chemikalie Ethyl Methan Sulfonat (EMS) zufällige Mutationen im Genom der

Fliege und testeten die mutierten Fliegen auf ihren Rhythmus. Dabei fanden sie drei Mutanten, die alle Punktmutationen im gleichen Gen – dem *period*-Gen – trugen. Zwei der Mutanten hatten zu schnell bzw. zu langsam laufende Uhren, die dritte Mutante, die sich als *period*-Null-Mutante entpuppte, war arrhythmisch (Abbildung 1). Der Mensch hat drei *period*-Gene, die ähnlich wichtig für einen normalen Rhythmus sind. Eine Mutation im *period2*-Gen ist für das Familial-Advanced-Sleep-Phase-Syndrom (FASPS) verantwortlich, das durch stark verfrühte Schlafphasen charakterisiert ist. Träger dieser Mutation gehen in der Regel bereits gegen 18:00 zu Bett und stehen gegen 3:00 auf. Die *period*-Gene und die von ihnen codierten PER-Proteine interagieren mit weiteren Uhren-Genen und -Proteinen (bei der Fliege: Timeless/TIM, Clock/CLK, Cycle/CYC). Letztendlich hemmen Dimere aus PER und TIM die Transkription ihrer eigenen mRNA. Da diese Hemmung zeitverzögert geschieht, kommt es zu stabilen Oszillationen in der Menge der *period* und *timeless* mRNA und der PER- und TIM-Proteine. Die Uhren-Proteine wirken auf ähnliche Weise auf andere Gene und schalten diese rhythmisch ab, sodass in den Uhren-Zellen molekulare circadiane Oszillationen erzeugt werden. In Neuronen führt dies zu Rhythmen in der elektrischen Aktivität.

Die Uhren-Gene werden in vielen Zellen des Körpers exprimiert, sodass es viele circadiane Uhren gibt (auch als periphere Uhren bezeichnet, Exkurs). Bei Tieren gibt es allerdings eine übergeordnete Innere Uhr im Gehirn. Bei Säugetieren liegt diese in den suprachiasmatischen Kernen (Suprachiasmatic Nuclei = SCN). Die SCN steuern rhythmisches Verhalten und koordinieren die Rhythmen der peripheren Uhren. Sie bestehen aus 10 000 bis 50 000 kleinen Neuronen, die miteinander kommunizieren und gemeinsam einen stabilen Rhythmus erzeugen. Zwar scheint jedes einzelne Uhren-Neuron zur Erzeugung von stabilen Oszillationen fähig, aber die Periodenlänge einer Population von Uhren-Neuronen mit intakten Verbindungen ist stabiler, exakter und näher bei 24 Stunden als die von vielen isolierten Uhren-Neuronen. Neuere Untersuchungen zeigen, dass eine Population interagierender Uhren-Neurone sogar genetische Defekte in den Uhren-Genen kompensieren kann. Für die peripheren Oszillatoren gilt dies nicht. Sie sind nicht nur unfähig, den Rhythmusverlust von Einzelzellen zu kompensieren, sondern sie geraten auch außer Phase, sobald sie in Kultur gehalten werden und die Verbindung zur Inneren Uhr im Gehirn verlieren. Damit kommt der neuronalen

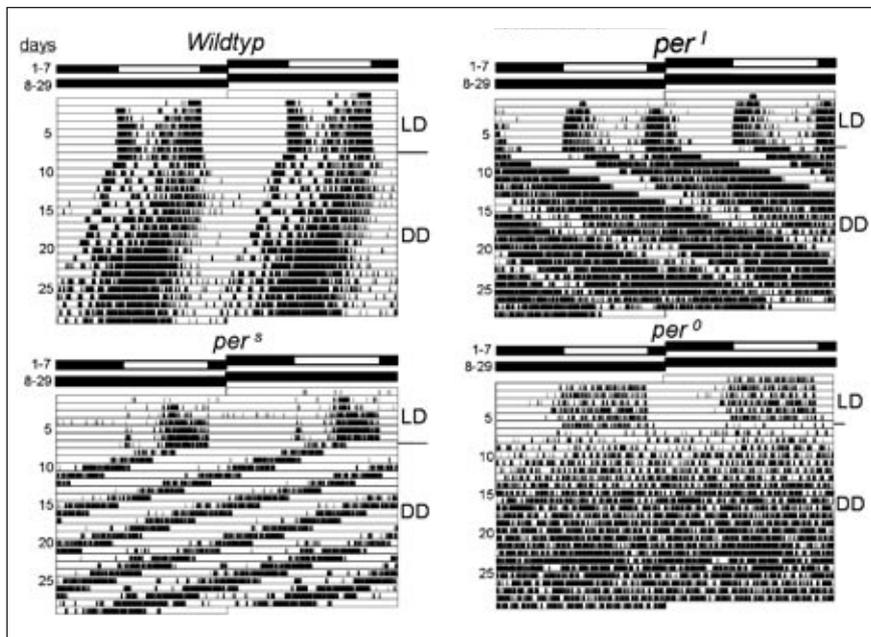


Abb. 1: Die period-Mutanten. Es ist jeweils ein typisches Aktogramm (Doppelplot der Aktivität) von einer wildtypischen Fliege, einer *per^{short}* (*per^s*)-Mutante, einer *perlong* (*per^l*) und einer *pernull* *per^o*-Mutante gezeigt. Zunächst waren die Fliegen für sieben bis acht Tage in einem Licht-Dunkel-Zyklus (12 Stunden Licht/ 12 Stunden Dunkel (LD)) und zeigen mit Ausnahme der *per^o*-Mutante zwei Aktivitätsgipfel, einen am Morgen und einen am Abend. Am achten oder neunten Tag wurde das Licht ausgemacht (DD), und die Fliegen laufen mit der ihr endogenen Periodenlänge frei. Bei Wildtyp-Fliegen liegt diese nahe bei 24 Stunden. *per^s*-Mutanten haben dagegen eine schnell gehende Uhr (~19 Stunden Periode), während *per^l*-Mutanten eine langsame Uhr besitzen (~28 Stunden Periode). *per^o*-Mutanten sind unter Konstantbedingungen arrhythmisch.

Kommunikation der Uhren-Neurone bei der stabilen Rhythmuserzeugung eine große Bedeutung zu.

Neben der Bedeutung der neuronalen Kommunikation zwischen den Uhren-Neuronen für die Rhythmuserzeugung gibt es Hinweise, dass den verschiedenen Uhren-Neuronen unterschiedliche Rollen zukommen. Manche könnten vorwiegend in der Verarbeitung der externen Licht- und Temperatursignale zur Synchronisation der Uhr verwickelt sein, während andere rhythmische Signale an andere Gehirnbereiche weitergeben. Es gibt auch Hinweise, dass manche Uhren-Neurone unterschiedliche Aktivitätsanteile steuern. So scheint es bei manchen Tieren Morgen-Neurone zu geben, die die Morgenaktivität steuern und Abend-Neurone, die für die Abendaktivität verantwortlich sind (zusammengefasst in Vansteensel et al. 2008; Helfrich-Förster 2009).

Zum Verständnis der Funktionsweise des neuronalen Netzwerkes der Inneren Uhr im Gehirn ist es zunächst hilfreich, die Rolle einzelner Uhren-Neurone aufzuklären. Wegen der vergleichsweise geringen Zahl von Uhren-Neuronen (~150 statt ~10 000

pro Gehirnhemisphäre) ist die Tauflye *Drosophila melanogaster* prädestiniert für solche Untersuchungen. Weiterhin kann die Fliege relativ leicht genetisch manipuliert werden, und z.B. Uhren-Gene in spezifischen Uhren-Neuronen ausgeschaltet werden. Die so manipulierten Fliegen können dann auf ihr rhythmisches Verhalten untersucht und die Rolle einzelner Uhren-Neurone im Netzwerk bestimmt werden. Im Folgenden wird der Erkenntnisstand dieser Untersuchungen zusammengefasst.

Das neuronale Uhrennetzwerk von *Drosophila melanogaster*

Die Uhren-Gene werden in ca. 150 Neuronen des *Drosophila*-Gehirns exprimiert (Abbildung 2). Dazu kommen viele Gliazellen (nicht gezeigt). Die 150 Neurone liegen im lateralen und dorsalen Gehirn und werden deshalb auch als laterale und dorsale Uhr-Neurone bezeichnet (genauere Unterteilung in Abbildung 2).

Die Neurone innerhalb der Gruppen unterscheiden sich in Projektionsmuster und verwendeten Neurotransmittern. Wie bei vielen Insekten verzweigen fast alle Uhren-

Neurone von *Drosophila* in der sogenannten akzessorischen Medulla. Dies ist ein kleines Neuropil an der Basis der Medulla, das Eingänge von Photorezeptoren bekommt und als Kern der Inneren Uhr bei Insekten gilt. Ein weiteres Verzweigungsgebiet fast aller Uhren-Neurone ist das dorsale Protocerebrum, das allgemein als Ausgangsregion der Inneren Uhr angesehen wird. Im dorsalen Protocerebrum gibt es Verbindungen zu fast allen Gehirnregionen, auch zu den absteigenden Bahnen ins thorakale Nervensystem. Ebenso können die Uhren-Neurone im dorsalen Protocerebrum Kontakt zum neuroendokrinen System der Fliege in der Pars intercerebralis und Pars lateralis knüpfen. Damit können rhythmische Signale überall ins Gehirn weitergeleitet werden.

Die lateralen Neurone als Haupt-Uhren-Neurone

Nicht alle Uhren-Neurone sind gleich wichtig für die Aktivitätsrhythmik der Fliege. Durch Genmanipulation konnte die Expression des *period*-Gens auf wenige Uhren-Neurone beschränkt werden, und es zeigte sich, dass *period* in den lateralen Neuronen benötigt wird, damit die Fliegen unter Konstantbedingungen rhythmisch sind. Umgekehrt bewirkte die Zerstörung der lateralen Neuronen arrhythmisches Verhalten unter Konstantbedingungen. Dies spricht für die lateralen Neurone als Haupt-Uhren-Neurone. Die dorsalen Neurone haben unter Konstantbedingungen eher eine untergeordnete Funktion, reichen allerdings aus, um unter Licht-Dunkel-Zyklen fast normale Aktivitätsrhythmen zu erzeugen.

Im Folgenden möchte ich mich auf die Funktion der lateralen Neuronen beschränken. Auch unter ihnen gibt es funktionelle Unterschiede. Interessanterweise reicht die *period*-Expression in den vier kleinen *PDF*-positiven *LN_v* aus, um rhythmische Aktivität unter Dauerdunkelbedingungen hervorzurufen (Grima et al. 2004). In schwachem Dauerlicht werden die Tiere jedoch in der Regel arrhythmisch. Dieser Sachverhalt ist umgekehrt, wenn die *period*-Expression auf die drei *CRY*-positiven *LN_d* und das fünfte kleine *LN_v* beschränkt wird (Rieger et al. 2009): Solche Fliegen sind rhythmisch unter schwachem Dauerlicht und eher arrhythmisch unter Dauerdunkel. Noch ist nicht klar, was dies für die Funktion der Inneren Uhr unter natürlichen Bedingungen bedeutet, aber diese Ergebnisse zeigen, dass die lateralen Neuronen unterschiedlich auf schwaches Licht reagieren.

Bemerkenswert an diesen Studien ist die Tatsache, dass nur jeweils vier Uhren-

Neurone pro Gehirnhemisphäre ausreichen, um quasi-normales rhythmisches Verhalten zu erzeugen. Im Dauerdunkel sind dies die vier *PDF*-positiven *s-LN_v* und im schwachen Dauerlicht sind es das fünfte kleine *LN_v* und die drei *CRY*-positiven *LN_d*.

Hell- und Dunkel- Neurone, oder Morgen- und Abend-Neurone?

Die oben genannten Untersuchungen weisen bereits auf eine unterschiedliche Lichtempfindlichkeit der lateralen Neuronen hin und sprechen dafür, dass einige Uhren-Neurone im Licht dominieren und andere im Dunkeln. Dies hat Forscher zu folgender Hypothese gebracht: Es gibt „Hell-Neurone“, die die Aktivität der Tiere am Tag und insbesondere an langen Sommertage steuern, und es gibt „Dunkel-Neurone“, die die Aktivität der Tiere in der Nacht, insbesondere in langen Winternächten steuern (Stoleru et al. 2007; Picot et al. 2007). Die Aktivitätsmuster der meisten Tiere unterscheiden sich zu den verschiedenen Jahreszeiten. Nach der Hell-Dunkel-Hypothese könnte man dies bei Taufliegen durch unterschiedliche Eigenschaften von Hell- und Dunkel-Neuronen erklären.

Ein anderes Modell erklärt die jahreszeitliche Anpassung an Lang- und Kurztage durch Morgen- und Abendoszillatoren. Viele Tiere haben zwei Hauptaktivitätsgipfel, einen am Morgen und einen am Abend (Abbildung 1). An langen Sommertagen liegt die Morgenaktivität früher am Morgen und die Abendaktivität später am Abend als an kurzen Wintertagen. Auf diese Weise vermeiden die Tiere während der Mittagshitze aktiv zu sein. Pittendrigh und Daan postulierten 1976 für nachtaktive Nagetiere, dass die Morgen- und Abendaktivitäten von unterschiedlichen Oszillatoren mit unterschiedlichen Reaktionen auf Licht gesteuert werden. Während die Morgenoszillatoren durch Licht beschleunigt werden, werden die Abendoszillatoren durch Licht verlangsamt. Auf diese Weise schiebt sich die Morgenaktivität im Sommer in den frühen Morgen und die Abendaktivität in den späten Abend. Tatsächlich fanden wir, dass die molekularen Oszillationen in manchen lateralen Neuronen durch Licht beschleunigt wurden, während sie in anderen verlangsamt wurden. Interessanterweise sind die Morgen-Neurone der Fliege weitgehend mit den oben beschriebenen Dunkel-Neuronen identisch, während die Abend-Neurone den Hell-Neuronen entsprechen.

Fasst man beide Ergebnisse zusammen, so gibt es in der Fliege Dunkel-Neurone, die die Morgenaktivität der Tiere steuern und durch Licht beschleunigt werden und

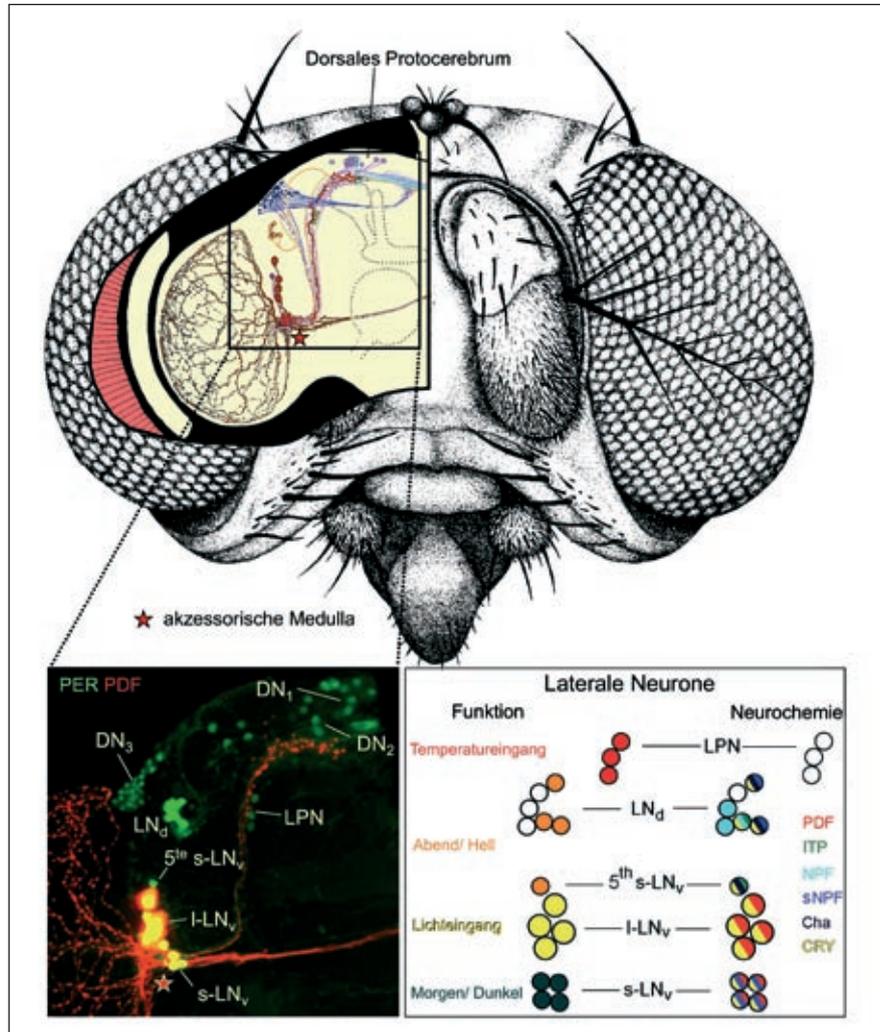


Abb. 2: Das Netzwerk an Uhren-Neuronen im Gehirn von *Drosophila*.

Pro Gehirnhemisphäre gibt es ~150 Uhren-Neurone, die in drei Hauptgruppen von lateralen Neuronen – die *LN_v*, *LN_d* und *LPN* – und in drei Gruppen von dorsalen Neuronen – die *DN1*, *DN2* und *DN3* - unterteilt werden können. Die Uhren-Neurone projizieren ins dorsale Protocerebrum und in die akessorische Medulla. Die lateralen Neuronen sind bezüglich Funktion und Neurochemie gesondert dargestellt. Die *LPN* sind Temperatureingangs-Neurone, deren Neurotransmitter noch unbekannt sind. Drei der sechs *LN_d* stellen zusammen mit der sogenannten fünften *s-LN_v* (*5th s-LN_v*) die Abend/Hell-Neurone dar. Diese Neurone exprimieren alle das Blaulichtfotopigment Cryptochrom (*CRY*). Ein Neuron der *CRY*-positiven *LN_d* exprimiert zusätzlich das Neuropeptid F (*NPF*) und das Ionen-Transporter-Peptid (*ITP*), während die anderen zwei die kurze Form von *NPF* (*sNPF*) und die Cholin-Acetyltransferase (*Cha*) enthalten, also acetylcholinerg sind. Das fünfte *s-LN_v* enthält *ITP* und *sNPF*. Die Funktion der *CRY*-negativen *LN_d* ist noch unbekannt; zwei der Zellen sind *NPF*-positiv. Die restlichen *LN_v* bestehen aus vier Neuronen mit großen Somata und vier Neuronen mit kleinen Somata (*I-LN_v* und *s-LN_v*) und sind alle *CRY*- und *PDF*-positiv. Die großen Neuronen sind in den Lichteingang involviert, während die kleinen die Morgen/Dunkel-Neurone darstellen und zusätzlich zu *CRY* und *PDF* auch noch *sNPF* exprimieren.

Hell-Neurone, die die Abendaktivität steuern und durch Licht verlangsamt werden. Dies klingt einfach und einleuchtend. Trotzdem ist Vorsicht geboten, denn die oben genannten Ergebnisse wurden bei schwachem Dauerlicht gewonnen (unter 1 Lux) oder nachdem die Lichtempfindlichkeit der Neurone

künstlich herabgesetzt wurde. Bei Dauerlicht höherer Intensität werden die Fliegen und die molekularen Oszillationen in den Uhr-Neuronen arrhythmisch (Diskussion in Helfrich-Förster 2009). Allerdings sind Licht-Dunkel-Zyklen kein Dauerlicht, und da die Lichtempfindlichkeit der Inneren Uhr



am Tag generell gering ist, könnten beide Modelle ihre Richtigkeit haben. Zukünftige Untersuchungen müssen klären, wie die natürliche Anpassung an unterschiedliche Tageslängen erfolgt.

Interessant an dieser Stelle ist die Tatsache, dass es Uhren-Neurone mit unterschiedlichen Eigenschaften und Aufgaben zu geben scheint. Dass Uhren-Neurone tatsächlich unterschiedlich auf Kurz- und Langtagbedingungen reagieren können, wurde inzwischen bei Mäusen bestätigt (Inagaki et al. 2007).

Der Lichteingang in die Innere Uhr

Offensichtlich werden die Uhren-Neurone stark durch Licht beeinflusst. Dies ist nicht verwunderlich, denn Licht ist der Zeitgeber, der die Innere Uhr am besten auf den 24-Stunden-Tag synchronisieren kann. Aber warum werden die Fliegen bei höheren Lichtintensitäten arrhythmisch?

Zur Wahrnehmung des Lichts benutzen die Innere Uhren allgemein mehrere Fotorezeptoren. Dazu gehören in der Regel spezialisierte Fotopigmente der Augen und bei Nicht-Säugetieren zusätzlich Fotorezeptoren im Gehirn. Bei *Drosophila* dienen Rhodopsine der Augen und eines extraretinalen Äugleins als Fotorezeptoren der Inneren Uhr. Zusätzlich wird das Blaulichtfotopigment Cryptochrom (CRY) in vielen Uhren-Neuronen exprimiert (Abbildung 2). Durch Licht aktiviertes CRY interagiert direkt mit dem Uhren-Protein TIM und bewirkt dessen schnelle Degradation. Dadurch stoppt der molekulare Rhythmus in den Uhren-Neuronen, und die Fliegen werden arrhythmisch.

Man könnte also meinen, dass die CRY-positiven Neurone besonders lichtempfindlich sind und deshalb zu den Dunkel-Neuronen gehören. Dies ist jedoch nicht der Fall. Sowohl Dunkel- als auch Hell-Neurone haben CRY, und *Timeless* wird bei Lichteinfluss auch in den CRY-negativen Neuronen schnell abgebaut (Yoshii et al. 2008). Dies liegt wahrscheinlich an einer effektiven neuronalen Kommunikation zwischen den Uhren-Neuronen. Außerdem konnten wir zeigen, dass die Komplexaugen und nicht Cryptochrom die oben diskutierte Anpassung der Fliegen an unterschiedliche Tageslängen bewirken.

Tatsächlich gibt es Uhren-Neurone, die direkt von den Fotorezeptorzellen der Komplexaugen innerviert zu werden scheinen und besonders stark auf Licht reagieren. Dies sind die *PDF*-positiven großen LN_v ($1-LN_v$, Abbildung 2). Die $1-LN_v$ spielen keine Rolle für die Aktivi-

tätsrhythmik unter Konstantbedingungen, aber sie reagieren auf Licht mit einer starken Depolarisation und sind für die sogenannte „Startle Response“ der Fliegen verantwortlich, eine kurze hohe Aktivität nach Einschalten des Lichts. Da die $1-LN_v$ außerdem generell die Wachheit der Fliegen fördern und Schlaf verhindern, werden sie auch als „Arousal“-Neurone bezeichnet (Parisky et al. 2008; Sheeba et al. 2008; Shang et al. 2008). Die $1-LN_v$ exprimieren das Neuropeptid *PDF*, und die Lichteffekte scheinen durch dieses Peptid vermittelt zu werden, denn sie verschwinden, wenn der *PDF*-Signalweg unterbrochen wird.

Interessanterweise haben erhöhte *PDF*-Spiegel im Gehirn (hervorgerufen durch Überexpression von *PDF* oder Fehlprojektionen der $1-LN_v$) ähnliche Effekte wie schwaches Dauerlicht: Die Oszillationen der Morgen-Neurone (Dunkel-Neurone) werden beschleunigt und die der Abend-Neurone (Hell-Neurone) werden verlangsamt (Yoshii et al. 2009a). Diese Ergebnisse bestätigen die Rolle der $1-LN_v$ und des Neuropeptids *PDF* im Lichteingang zur Inneren Uhr und damit auch in der Anpassung an unterschiedliche Tageslängen. Tatsächlich können *pdf*-Null-Mutanten ihre Morgen- und Abendaktivitäten nicht mehr normal an Kurz- und Langtage anpassen.

Die LPN Neurone als Temperatureingangs-Neurone

Wie eingangs erwähnt synchronisieren auch Temperaturzyklen die Innere Uhr auf den 24-Stunden-Tag. Temperaturzyklen werden in den Chordotonalorganen im Körper der Fliegen wahrgenommen und von dort über unbekannte Wege zu den Uhren-Neuronen weitergegeben (Sehadova et al. 2009). Interessanterweise reagieren die Uhren-Neurone unterschiedlich stark auf Temperaturzyklen. So lassen sich die LPN (und einige dorsale Neurone) besonders gut durch Temperaturzyklen synchronisieren, während sich die $1-LN_v$ nur durch Licht-Dunkel-Zyklen synchronisieren lassen. So scheint es also ausgesprochene Lichteingangs-Uhren-Neurone (die $1-LN_v$) und ausgesprochene Temperatureingangs-Neurone (die LPN) zu geben (Yoshii et al. 2009b).

Die Kommunikation zwischen den Uhren-Neuronen

Nun haben wir die unterschiedlichen Rollen der verschiedenen lateralen Neuronen kennengelernt: Die $s-LN_v$ fungieren als

Morgen-/Dunkel-Neurone, das fünfte $s-LN_v$ und die CRY-positiven LN_d als Abend-/Licht-Neurone, die $1-LN_v$ als Licht- und die LPN als Temperatureingangs-Neurone (Abbildung 2).

Bei den unterschiedlichen Aufgaben der Zellen ist eine gute Kommunikation zwischen ihnen erforderlich. Im SCN von Säugern kommunizieren die Uhren-Neurone mittels des Neuropeptids VIP („Vasoactive Intestinal Polypeptide“; zusammengefasst in Vosko et al. 2007). 15% der SCN-Neuronen haben VIP als Transmitter und 60% der SCN-Neuronen exprimieren den VIP-Rezeptor. Das Aktivitätsmuster von VIP- oder VIP-Rezeptor-Null-Mutanten zerfällt unter Konstantbedingungen in viele Komponenten und schließlich werden die Tiere arrhythmisch.

PDF-Null-Mutanten werden unter Dauerdunkel-Bedingungen auf ähnliche Weise arrhythmisch wie VIP-Null-Mutanten. Taghert und Mitarbeiter konnten 2004 erstmals zeigen, dass die molekularen Oszillationen der $s-LN_v$ (Morgen/ Dunkel-Neurone) in *PDF*-Null-Mutanten asynchron werden. Das Gleiche gilt für einige dorsale Neurone. Anscheinend dient *PDF* zusätzlich zu seiner Rolle als Eingangssignal auch als wichtiger Kommunikationsfaktor zwischen den Uhren-Neuronen. Tatsächlich wird der *PDF*-Rezeptor in den meisten Uhren-Neuronen exprimiert und *PDF*-Rezeptor-Null-Mutanten zeigen einen ähnlichen Phänotyp wie *PDF*-Null-Mutanten (Hyun et al. 2005). Der *PDF*-Rezeptor ist ein G-Protein gekoppelter Rezeptor, und das *PDF*-Signal erhöht den cAMP-Spiegel in nachgeschalteten Uhren-Neuronen (Shafer et al. 2008). Andere Peptide, die als Neurotransmitter der laterale Neurone dienen, sind die kurze und lange Form von Neuropeptid F (NPF), Homologe des Säugerneuropeptids Y, sowie das Ionen-Transporter-Peptid ITP (Johard et al. 2009). Ihre Rolle im Uhrennetzwerk muss durch zukünftige Untersuchungen geklärt werden.

Ausblick

Noch sind viele Fragen offen. Nicht alle Neurone im Uhrennetzwerk sind charakterisiert, man weiß nichts über die Art ihrer synaptischen Kontakte und auf welche Neurone sie verschalten, um rhythmische Signale weiterzugeben. Auch über die Signalkaskaden in den Uhren-Neuronen ist nichts bekannt, und man hat erst damit begonnen, sie elektrophysiologisch zu charakterisieren. Hier könnte sich die Forschung an *Drosophila* und größeren Insekten wie Schaben, Grillen, Heuschrecken und Bie-

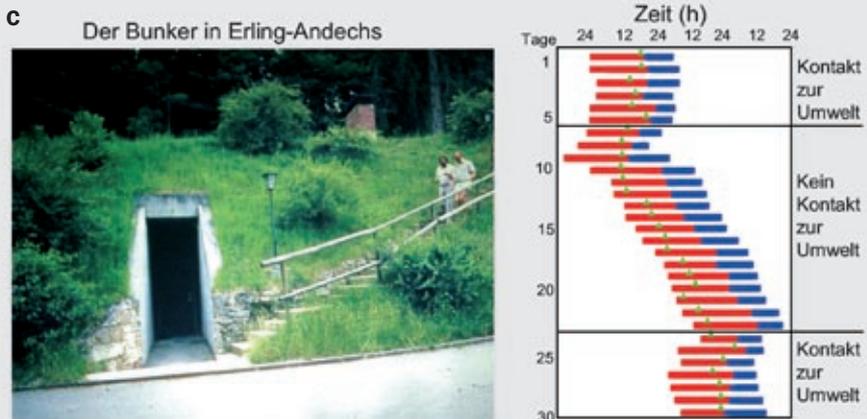
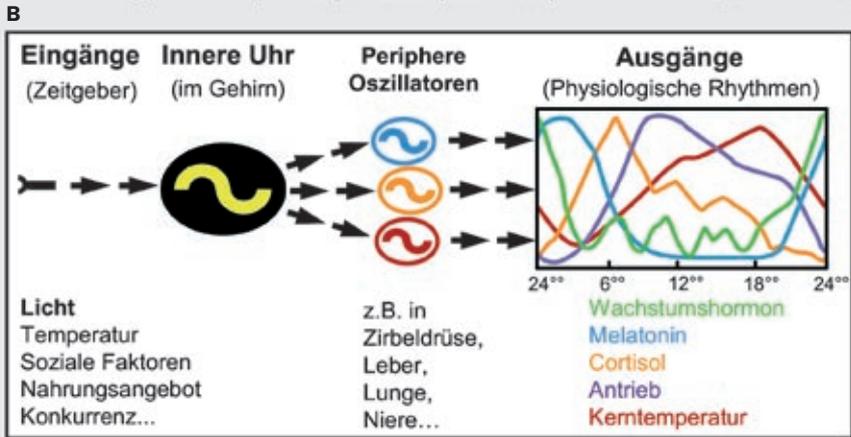
Exkurs

Die Chronobiologie und ihre Väter

Mitte des 20. Jahrhunderts haben Bünning, Aschoff und Pittendrigh die Lehre über Innere Uhren (die Chronobiologie) als eigenständigen Wissenschaftszweig etabliert. (A) Bünning forschte in erster Linie an Pflanzen, zeigte die genetische Basis und den Selektionsvorteil von Inneren Uhren auf und war ein starker Vertreter der Multioszillatortheorie, die besagt, dass viele Uhren bei der Kontrolle der physiologischen Rhythmen zusammenwirken. Aschoff forschte hauptsächlich am Menschen und zeigte Mitte der 1960er-Jahre in seinen Bunkerversuchen in Erling-Andechs, dass Menschen eine Innere Uhr mit relativ langer Periodenlänge haben (siehe C). Pittendrigh arbeitete vorwiegend an *Drosophila*, aber auch an Nagetieren und formulierte viele Gesetzmäßigkeiten Innerer Uhren, die bis heute Gültigkeit haben.

(B) Innere Uhren im Gehirn werden durch verschiedene Zeitgeber (Eingänge) auf den 24-Stunden-Rhythmus der Erde synchronisiert, wobei Licht der wichtigste ist. Sie kontrollieren periphere Oszillatoren, die wiederum unterschiedliche physiologische Rhythmen steuern. Einige dieser Rhythmen sind am Beispiel des Menschen dargestellt. Geraten diese Rhythmen auf Dauer durcheinander, z.B. durch Nacht- und Schichtarbeit, kann dies krank machen. (C) Schematische Wiedergabe des Rhythmus eines Menschen im Bunkerversuch. Die Person befand sich für 4 Wochen im Bunker. In der ersten und letzten Woche bestand Kontakt mit der Außenwelt, während der zwei mittleren Wochen war die Person in Isolation. Dargestellt ist der Wach (rot) – Schlaf (blau) - Rhythmus sowie die Temperaturmaxima (grüne Dreiecke) in Form eines Aktogramms. Dabei sind die Tage 1 bis 30 untereinander gedruckt und zur besseren Übersicht vier Tage auch nebeneinander. In der ersten und letzten Woche wird die Person regelmäßig um

Die Väter der Chronobiologie



~9:00 aktiv und geht um ~24:00 schlafen. Sobald sie keine Zeitinformation mehr hat, verschieben sich Aktivitäts- und Schlafphase jeden Tag um ~2 Stunden nach hinten. Die Rhythmik läuft mit einer endogenen Periodenlänge von 26,1 Stunden frei. Dabei verschiebt sich auch

die Lage des Temperaturmaximums vom Abend auf den Vormittag. Diese Person hat eine ungewöhnlich langsame Innere Uhr. Nach neueren Erkenntnissen liegt die durchschnittliche Periodenlänge der Inneren Uhr des Menschen bei ~24,5 Stunden.

nen gegenseitig befruchten. Bei einigen Insekten ist die Innere Uhr neuronal gut charakterisiert und elektrophysiologisch zugänglich. Andere zeigen differenzierte Verhaltensweisen, die von der Inneren Uhr abhängen. So konnte kürzlich an der Wüstenheuschrecke durch konsequente elektrophysiologische Ableitungen der Weg vom polarisierten Licht bis hin zur

Himmelskompassorientierung aufgeklärt werden (Heinze und Homberg 2009). Was noch fehlt ist der genaue Input der Inneren Uhr für die Zeitkompensation. Ein Brückenschlag zwischen Verhaltensphysiologie, Elektrophysiologie und Neurogenetik sollte es in der Zukunft möglich machen, die Funktionsweise Innerer Uhren an Insektenmodellen vollständig aufzuklären.

Literatur

- Grima, B., Chelot, E., Xia, R. und Rouyer, F. (2004): Morning and evening peaks of activity rely on different clock neurons of the *Drosophila* brain. *Nature* 431: 869-873.
- Heinze, S. und Homberg, U. (2009): Linking the Input to the Output: New Sets of Neurons Complement the Polarization Vision Network



- in the Locust Central Complex. *J. Neurosci.* 29: 4911-4921.
- Helfrich-Förster, C. (2009): Does the morning and evening oscillator model fit better for flies or mice? *J. Biol. Rhythms* 24: 259-270.
- Hyun, S., Lee, Y., Hong, S.T., Bang, S., Paik, D., Kang, J., Shin, J., Lee, J., Jeon, K., Hwang, S., Bae, E. und Kim, J. (2005): *Drosophila* GPCR Han is a receptor for the circadian clock neuropeptide PDF. *Neuron* 48: 267-278.
- Inagaki, N., Honma, S., Ono, D., Tanahashi, Y. und Honma, K. (2007): Separate oscillating cell groups in mouse suprachiasmatic nucleus couple photoperiodically to the onset and end of daily activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 7664-7669.
- Johard, H., Yoshii, T., Dirksen, H., Cusumano, P., Rouyer, F., Helfrich-Förster, C. und Nässel, D. (2009): Peptidergic Clock Neurons in: Ion Transport Peptide and Short Neuropeptide F in Subsets of Dorsal and Ventral Lateral Neurons. *J. Comp. Neurol.* 516: 59-73.
- Parisky, K.M., Agosto, J., Pulver, S.R., Shang, Y., Kuklin, E., Hodge, J.J., Kang, K., Liu, X., Garrity, P.A., Rosbash, M. und Griffith, L.C. (2008): PDF cells are a GABA-responsive wake-promoting component of the *Drosophila* sleep circuit. *Neuron* 60: 672-682.
- Picot, M., Cusumano, P., Klarsfeld, A., Ueda, R. und Rouyer, F. (2007): Light activates output from evening neurons and inhibits output from morning neurons in the *Drosophila* circadian clock. *PLoS Biol.* 5: e315.
- Rieger, D., Wülbeck, C., Rouyer, F. und Helfrich-Förster, C. (2009): Period gene expression in four neurons is sufficient for rhythmic activity of *Drosophila* melanogaster under dim light conditions. *J. Biol. Rhythms* 24: 271-282.
- Sehadova, H., Glaser, F.T., Gentile, C., Simoni, A., Giesecke, A., Albert, J.T. und Stanewsky, R. (2009): Temperature Entrainment of *Drosophila's* Circadian Clock Involves the Gene nocte and Signaling from Peripheral Sensory Tissues to the Brain. *Neuron* 64: 251-266.
- Shafer, O.T., Kim, D.J., Dunbar-Yaffe, R., Nikolaev, V.O., Lohse, M.J. und Taghert, P.H. (2008): Widespread receptivity to neuropeptide PDF throughout the neuronal circadian clock network of *Drosophila* revealed by realtime cyclic AMP imaging. *Neuron* 58: 223-237.
- Shang, Y., Griffith, L.C. und Rosbash, M. (2008): Light-arousal and circadian photoreception circuits intersect at the large PDF cells of the *Drosophila* brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 19587-19594.
- Sheeba, V., Fogle, K.J., Kaneko, M., Rashid, S., Chou, Y.T., Sharma, V.K. und Holmes, T.C. (2008): Large ventral lateral neurons modulate arousal and sleep in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 18: 1537-1545.
- Stoleru, D., Nawathean, P., Fernandez, M.P., Menet, J.S., Ceriani, M.F. und Rosbash, M. (2007): The *Drosophila* circadian network is a seasonal timer. *Cell* 129: 207-219.
- Vansteensel, M. J., Michel, S. und Meijer, J. (2008): Organization of cell and tissue circadian pacemakers: A comparison among species. *Brain Res. Reviews* 58: 18-47.
- Vosko, A.M., Schroeder, A., Loh, D.H. und Colwell, C.S. (2007): Vasoactive Intestinal Peptide and the Mammalian Circadian System. *Gen Comp Endocrinol.* 152: 165-175.
- Yoshii, T., Todo, T., Wülbeck, C., Stanewsky, R. und Helfrich-Förster, C. (2008): Cryptochrome operates in the compound eyes and a subset of *Drosophila's* clock neurons. *J. Comp. Neurol.* 508: 952-966.
- Yoshii, T., Wülbeck, C., Sehadova, H., Veleri, S., Bichler, D., Stanewsky, R. und Helfrich-Förster, C. (2009a): The neuropeptide Pigment-Dispersing Factor adjusts period and phase of *Drosophila's* clock. *J. Neurosci.* 29: 2597-2610.
- Yoshii, T., Vanin, S., Costa, R. und Helfrich-Förster, C. (2009b): Synergic entrainment of *Drosophila's* circadian clock by light and temperature. *J. Biol. Rhythms* 24: 452-464.
- Eine vollständige Literaturliste kann bei der Autorin angefordert werden.

Danksagung

Die Autorin dankt Alois Hofbauer für Kommentare zum Manuskript. Die Arbeiten der Gruppe werden durch Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der EU gefördert.

Kurzbiografie

Charlotte Förster: geboren 1957; Studium der Biologie an den Universitäten Stuttgart und Tübingen. Promotion 1985. Habilitation 2000. Von 2001 bis Oktober 2009 Professorin für Zoologie an der Universität Regensburg. Seit Oktober 2009 Professorin für Neurobiologie und Genetik an der Universität Würzburg.

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. Charlotte Förster
 Universität Würzburg
 Lehrstuhl für Neurobiologie und Genetik
 Theodor Boveri Institut, Biozentrum
 Am Hubland
 97074 Würzburg
 Tel.: +49 931 3188823
 E-Mail: charlotte.foerster@biozentrum.uni-wuerzburg.de

Neueintritte

Folgende Kolleginnen und Kollegen dürfen wir als Mitglieder der Neurowissenschaftlichen Gesellschaft begrüßen:

Brandsch, Daniela (Freiburg)
 Brenes Sáenz, Juan Carlos (Marburg)
 Brockmann, Marco David (Hamburg)
 Budinger, Dr. Eike (Magdeburg)
 Düster, Robert (Bonn)
 Eiberger, Dr. Britta (Bonn)
 Eichler, Dr. Sabrina (Berlin)
 Foerster, Dipl. Biologe Benjamin (Berlin)
 Franze, Dr. Kristian (Cambridge, UK)
 Fredrich, Diplombiologin, PhD Michaela (Freiburg)
 Fritsch, Dr. Brita (Freiburg)
 Genewsky, Andreas (Regensburg)
 Grieb, Benjamin (Hamburg)
 Heyd, Julia (Potsdam)
 Jacobi, Anne (München)
 Kardinal, Mareike (Saarbrücken)
 Lang, Claudia (München)
 Latal, Dr. Tobias (Göttingen)
 Linnertz, Regina (Leipzig)
 Lorbeer, Christina (Hannover)
 Macharadze, Dr. Tamar (Magdeburg)
 Markopoulos, Christian (Bonn)
 Meier, Prof. Dr. Jochen (Berlin)
 Minge, Daniel (Hamburg)
 Neufang, Dr. Susanne (München)
 Oschmann, Dr. Jan (Magdeburg)
 Penninella, Dipl. Biol. Donato (Gießen)
 Pielot, Dr. Rainer (Magdeburg)
 Poeschel, Dr. Beatrice (Hamburg)
 Polanski, Witold (Dresden)
 Reis, Dr. Janine (Freiburg)
 Rien, Diana (Bielefeld)
 Rossner, Dr. rer.nat. Moritz (Göttingen)
 Schmitt, Sebastian (Göttingen)
 Sheldrick, Dr. med. Abigail Jane (Aachen)
 Soppa, Dipl.-Biol. Ulf-Werner (Aachen)
 Sureshabu, Ramakrishnan (Bochum)
 Tedesco Triccas, Lisa (Southampton, UK)
 Ullrich, Céline (Innsbruck)
 Unichenko, Petr (Mainz)
 Von Nicolai, Constantin (Hamburg)

Der Mitgliedsstand zum 31. Januar 2010 beträgt 2.002 Mitglieder.

Soziale Signale erschnüffeln: chemische Kommunikation und das Vomeronasalorgan

Marc Spehr

Zusammenfassung

Bei den meisten Säugetieren kontrollieren innerartliche chemische Kommunikationsstrategien komplexes Sozial- und Sexualverhalten. Noch bis vor wenigen Jahren beruhte unser konzeptionelles Verständnis chemosensorischer Kommunikation auf der (simplistischen) Annahme einer strikt dichotomen Organisation des olfaktorischen Systems: zwei anatomisch wie funktional streng voneinander getrennte sensorische Systeme - das Riechepithel und das Vomeronasalorgan - detektieren jeweils eine von zwei grundsätzlich unterschiedlichen Arten chemischer Reize – allgemeine Gerüche versus „Pheromone“. Durch eine Vielzahl spannender und z.T. durchaus unerwarteter Befunde aus jüngster Zeit wird nunmehr klar: Die Organisationsstruktur des Geruchssinns ist weitaus komplexer und funktional differenzierter als ursprünglich angenommen. Mindestens vier anatomisch separierte olfaktorische Subsysteme, die vielfach eine bemerkenswerte Heterogenität in ihrer neuronalen Zusammensetzung aufweisen, detektieren distinkte (und in Teilen überlappende) Gruppen sensorischer Stimuli. Gelingt es uns, die spezifischen Rezeptortypen und nachgeschalteten Signalwege der verschiedenen Subsysteme im Detail zu verstehen und somit die Kodierungslogik sozialer chemischer Signale aufzuschlüsseln, werden wir letztlich entscheidende Erkenntnisse über die neurophysiologischen Grundlagen sozialen Verhaltens gewinnen.

Abstract

In most mammals, conspecific chemical communication strategies control complex social and sexual behavior. Just a few years ago, our concept of how the olfactory system is organized to ensure faithful transmission of social information built on the rather simplistic assumption that two fundamentally different classes of stimuli – ‚general‘ odors versus ‚pheromones‘ – are exclusively detected by either of two sensory structures: the main olfactory epithelium or the vomeronasal organ. A number of exciting recent findings, however, revealed a much more complex and functionally diverse organizational structure of the sense of smell. At least four anatomically segregated olfactory subsystems, some remarkably heterogeneous in their cellular composition, detect distinct, but partially overlapping populations of sensory stimuli. Discerning how subsystem-specific receptor architectures and signaling pathways orchestrate the coding logic of social chemosignals, will ultimately shed new light on the neurophysiological basis of social behavior.

Keywords: olfaction; social chemosignals; sensory neurophysiology; homeostatic plasticity; chemoreceptor

„Es gibt eine Überzeugungskraft des Duftes, die stärker ist als Worte, Augenschein, Gefühl und Wille. Die Überzeugungskraft des Duftes ist nicht abzuwehren, sie geht in uns hinein wie die Atemluft in unsere Lungen, sie erfüllt uns, füllt uns vollkommen aus, es gibt kein Mittel gegen sie“ – In seinem Roman *Das Parfum: Die Geschichte eines Mörders* [63] stellt Patrick Süskind kunstvoll die tiefen Emotionen dar, die durch die Wahrnehmung eines Duftes hervorgerufen werden können. Wie die Säugetiernase Tausende

verschiedener Düfte erkennt und zugleich voneinander unterscheidet, wie Geruchsinformation in verschiedenen Hirnarealen dekodiert wird und wie die Wahrnehmung eines bestimmten Geruchs längst vergessen geglaubte – angenehme wie abstoßende – Erinnerungen wecken kann, gehört zu den faszinierendsten Fragen moderner Neurowissenschaften. Die Nase ist ohne Zweifel *en vogue* und rückt zunehmend in das Zentrum neurosensorischer Forschungsinteressen. Dabei trägt gerade eine Reihe

von Befunden aus jüngster Zeit zu einer neuen konzeptionellen Perspektive auf die funktionale Architektur des Geruchssinns bei: Wir entwickeln ein neues Verständnis olfaktorischer Neurosensorik, das, zumindest in Teilen, fundamental von unseren bisherigen Vorstellungen abweicht.

Das theoretische Spektrum olfaktorischer Stimuli ist nahezu unbegrenzt. Diese enorme Komplexität strukturell verschiedener chemischer Signale hat im Laufe der Evolution eine Reihe unterschiedlicher sensorischer Zellpopulationen innerhalb der Säugetiernase hervorgebracht. Die einzelnen Neuronengruppen sind gekennzeichnet durch charakteristische Rezeptorexpressionsprofile und axonale Projektionsmuster. Diese Diversität, bei gleichzeitiger Spezialisierung auf bestimmte chemosensorische Funktionen, liegt dem Konzept olfaktorischer Subsysteme - der ‚noses within noses‘ [44] - zugrunde (Abb. 1).

Noch bis vor Kurzem ging man davon aus, dass das Riechsystem von Säugern aus lediglich zwei anatomisch wie funktional unterschiedlichen Teilen besteht: dem hauptolfaktorischen und dem akzessorischen (vomeronasalen) olfaktorischen System. Das hauptolfaktorische System, so die Annahme, nimmt vor allem Umgebungsgerüche wahr (um beispielsweise Art und Qualität von Nahrung zu prüfen), während dem akzessorischen System und seiner peripheren Struktur – dem Vomeronasalorgan – eine entscheidende Rolle bei der Detektion und Kommunikation sozial relevanter Chemosignale zugeschrieben wurde. Diese häufig als Pheromone bezeichneten Substanzen lösen bei Artgenossen stereotype Verhaltensmuster und / oder hormonelle Statusänderungen aus. Inzwischen ist eine weitaus komplexere Organisation des Geruchssinns und damit der chemosensorischen Mechanismen sozialer Kommunikation deutlich geworden [1][44]. Mit diesem neu gewonnenen Verständnis für die funktionale Diversität olfaktorischer Systeme stehen nun eine Reihe von neuen und spannenden Fragen weit oben auf der Agenda (chemo) sensorisch forschender Neurowissenschaftler: Welche unterschiedlichen Rezeptorstrukturen haben sich entwickelt, um jedem Subsystem ein ausreichendes Maß an Reizselektivität zu übertragen und dies aufrechtzuerhalten? Welche Transduktionsstrategien werden von den verschiedenen Zellpopulationen genutzt und warum? Welche funktionale Logik liegt der anatomischen Trennung der verschiedenen Subsysteme innerhalb der Nasenhöhle zugrunde? Wie wird Subsystem-spezifische Information zunächst getrennt verarbeitet und nachfolgend in übergeordneten Hirnzentren integriert?

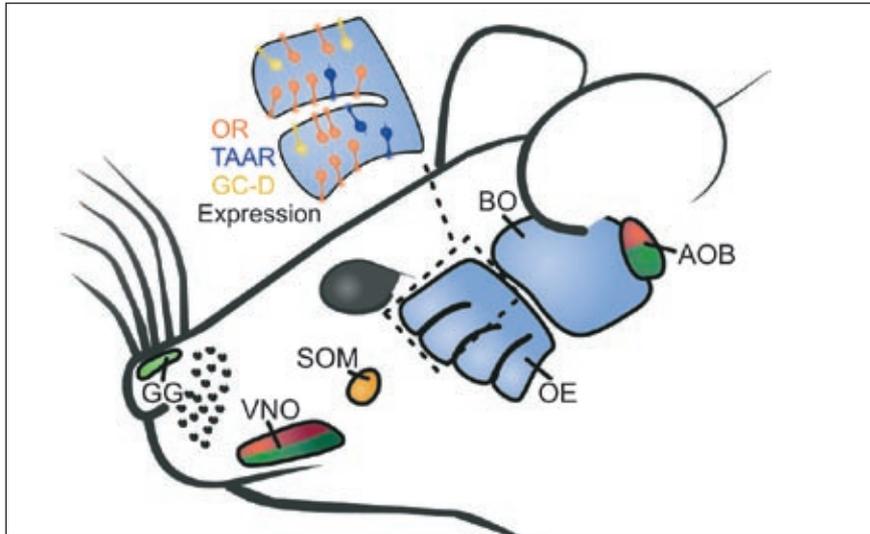


Abb. 1: Schematische Darstellung der olfaktorischen Subsysteme der Maus. Die Übersicht zeigt vier anatomisch klar voneinander abgegrenzte periphere sensorische Gewebe: das hauptolfaktorische Epithel (OE), das Septalorgan von Masera (SOM), das Grüneberg-Ganglion (GG) und das Vomeronasalorgan (VNO). Die Axone sensorischer Neurone des OE, des SOM und des GG projizieren auf glomeruläre Strukturen im Bulbus olfactorius (BO), vomeronasale Neurone hingegen bilden synaptische Kontakte mit Dendriten der Mitralzellen im akzessorischen olfaktorischen Bulbus (AOB). Im OE können mindestens drei Subpopulationen sensorischer Neurone anhand ihrer individuellen Rezeptorexpressionsprofile unterschieden werden. Die überwiegende Mehrheit der Neurone exprimiert ein Mitglied der großen Superfamilie kanonischer Geruchsrezeptoren (OR). Andere relativ kleine Gruppen sensorischer Zellen exprimieren entweder eine Typ D Rezeptor-Guanylatzyklase (GC-D) oder sog. ‚trace amine-associated‘ Rezeptoren (TAAR).

Subsysteme in der Säugetier Nase

Innerhalb der Chemosensorik markiert die Entdeckung der Multigenfamilie der Geruchsrezeptoren durch Linda B. Buck und Richard Axel [7] den Beginn der molekularen Ära. Gleichsam einer Initialzündung hat seither das wissenschaftliche Interesse an der Neurobiologie des Riechsystems kontinuierlich zugenommen.

Bei den meisten Säugetieren kleidet das hauptolfaktorische Neuroepithel die dorso-kaudalen Bereiche der Nasenscheidewand (Septum) und der inneren Nasenmuscheln (Endoturbinaten) aus. Hier exprimieren die „klassischen“/kanonischen olfaktorischen sensorischen Neurone jeweils exklusiv Proteine eines bestimmten Riechrezeptortyps, obwohl jeder Zelle theoretisch ein enormes Repertoire von Riechrezeptorgen (>1000 funktionelle Gene in Nagern, ~350 beim Menschen) zur Verfügung steht. Diese monogene (tatsächlich sogar monoallelische) Genexpression wird stringent kontrolliert: die Geneprodukte selbst – die Riechrezeptoren – üben einen negativen Rückkopplungsmechanismus auf die ansonsten weitgehend stochastische Expression aus [58][32]. Riechrezeptoren

besitzen die typischen Merkmale G-Proteingekoppelter Rezeptoren (GPCRs) wie z.B. sieben putativ transmembranäre α -Helices oder das konservierte DRY-Aminosäuremotiv [42]. Verschiedene hypervariable Aminosäureseitenketten innerhalb der Transmembrandomänen 3-6 bilden wahrscheinlich die Ligandenbindetasche. Von der Entdeckung der Riechrezeptorgenfamilie bis zur Publikation des ersten Rezeptor-Liganden-Paares vergingen sieben Jahre [70]. Seither konnten zwar etwa einer Handvoll Rezeptoren spezifische Duftmoleküle zugeordnet werden, doch der weitaus größere Teil der Riechrezeptoren wartet weiterhin auf die Deorphanisierung. Dieser substantiellen Informationslücke liegen die enormen Schwierigkeiten bei der rekombinanten Expression der Riechrezeptorproteine in heterologen Zellsystemen zugrunde. In Laboren weltweit stellt man sich die Frage, warum die rekombinant exprimierten Rezeptoren immer wieder in den Membranen des endoplasmatischen Retikulums bzw. des Golgi-Apparates „hängenbleiben“ und kaum eine Translokation zur Plasmamembran stattfindet [39]. Alle bisher charakterisierten Riechrezeptoren detektieren volatile Geruchsmoleküle verschiedener chemischer Klassen und besitzen relativ breite rezeptive Felder.

Vice versa können unterschiedliche Rezeptoren durch das gleiche Geruchsmolekül aktiviert werden; Geruchsinformation wird also kombinatorisch durch Aktivierung multipler, teilweise überlappender Rezeptorpopulationen kodiert [6][36]. Die Riechrezeptoren sind in hoher Dichte in den ziliären Membranen der olfaktorischen Neurone lokalisiert und lösen bei Ligandeninteraktion eine komplexe biochemische Signalkaskade aus, durch die der zytosolische cAMP-Spiegel innerhalb der Zilien vorübergehend massiv erhöht wird. Dies führt zur Öffnung zyklisch Nucleotid-gesteuerter (CNG) Ionenkanäle und, bedingt durch den lokalen Einstrom von Ca^{2+} , zur Aktivierung Ca^{2+} -gesteuerter Cl^- -Kanäle. Die Umwandlung der chemischen Bindungsenergie in ein elektrisches Signal wird durch die depolarisationsbedingte Generierung von Aktionspotentialen abgeschlossen [14]. Konvergente rezeptorspezifische axonale Projektionen zu wenigen Glomeruli im *Bulbus olfactorius* verleihen jedem Glomerulus eine individuelle „Rezeptor-Identität“ und ermöglichen somit die Kodierung von Geruchsinformationen in räumlichen (aber auch zeitlichen) Aktivitätsmustern, sog. odotopen Karten (odotopic activity ‚maps‘) [43].

Neben den kanonischen olfaktorischen Neuronen wurde 2006 im Labor von Linda B. Buck eine zweite Familie chemosensorischer GPCRs im Hauptriecheepithel identifiziert [33]. In einer cDNA-Bibliothek aus dem Riecheepithel der Maus fanden Lieberles und Buck Mitglieder der TAAR (trace amine-associated receptor) Proteinfamilie. Die selektiv-monogene TAAR Expression einzelner Neurone deutet auf eine eigene Funktion im Kontext der Geruchswahrnehmung biogener Amine hin. Eine genaue funktionale Charakterisierung der TAAR Neurone steht allerdings noch aus.

Sowohl TAAR Proteine als auch Riechrezeptoren sind typische Rhodopsin-artige (Familie A) GPCRs, die jeweils cAMP-abhängige Transduktionskaskaden in Gang setzen [45]. Allerdings transduziert eine dritte Gruppe sensorische Neurone des hauptolfaktorischen Epithels Geruchsinformationen augenscheinlich unabhängig von kanonischen Riechrezeptoren, TAAR Proteinen oder cAMP. Als gemeinsamen molekularen Marker exprimieren diese Neurone eine als GC-D bezeichnete Rezeptor-Guanylatzyklase [15]. Etwa 1 von 1000 olfaktorischen Neuronen exprimiert GC-D sowie weitere, an eine cGMP-vermittelte Transduktionskaskade erinnernde Signalproteine (Phosphodiesterase 2 und die CNG Kanaluntereinheit A3) [22][40]. Haben diese, als Cluster im dorsalen Dach der Nasenhöhle lokalisierten Neurone eine chemosensorische Funktion und, wenn ja,

welche? Die gemeinsame Struktur aller bisher identifizierten Rezeptor-Guanylatzyklen [16] – eine extrazelluläre peptidbindende Domäne, die über eine transmembranäre α -Helix an eine intrazelluläre katalytische Domäne gekoppelt ist – hat immer wieder zu Spekulationen über GC-D-positive olfaktorische Neurone als cGMP-abhängige Peptidsensoren geführt. Derzeit fehlt jedoch ein allgemein akzeptiertes Modell der olfaktorischen Funktion der GC-D Neurone. In zwei nahezu parallel publizierten Studien wurden 2007 verschiedene, z.T. kontroverse Funktionen GC-D-exprimierender Neurone postuliert [21] [30]. Hu et al. [21] berichten über CO_2 -vermittelte, Carboanhydrase II-abhängige Ca^{2+} -Signale in GC-D Neuronen. Untersuchungen an genetisch veränderten Mauslinien lassen jedoch einen anderen Schluss zu: Leinders-Zufall und Mitarbeiter [30] liefern eine schlüssige Beweisführung für eine Funktion GC-D-positiver Neurone als empfindliche und selektive Sensoren natriuretischer Peptide (Uroguanylin und Guanylin). Widersprechen sich diese Ergebnisse notwendigerweise? Anhand der pharmakologischen Profile der CO_2 -, wie auch der Peptid-abhängigen Ca^{2+} -Signale könnten beide postulierten Signalprozesse in einen gemeinsamen Transduktionsweg münden. In Zukunft ist also mit weiteren Studien zu rechnen, die zeigen werden, ob die bislang vorliegenden Ergebnisse in ein gemeinsames Funktionsmodell der GC-D Neurone integriert werden können, oder ob einem der beiden Mechanismen eine physiologisch dominante Funktion zukommt.

Zusätzlich zum hauptolfaktorischen Epithel und dessen neuronaler Heterogenität besitzen viele Säugetiere noch mindestens drei weitere olfaktorische Gewebe: das VNO, das Grüneberg-Ganglion (GG) und das Septalorgan von Masera (SOM). Somit erhält eine ohnehin komplexe Organisation einen zusätzlichen Grad an Diversität / Komplexität (Abb. 1). Verglichen mit unseren Kenntnissen über das hauptolfaktorische und, wenn auch weniger detailliert, über das Vomeronasalsystem steckt unser funktionales Verständnis der olfaktorischen Funktionen von Grüneberg-Ganglion und Septalorgan noch in den Kinderschuhen.

Das Septalorgan ist ein kleiner, relativ flacher, vom hauptolfaktorischen Epithel isoliert und in unmittelbarer Nähe zum Eingang des *Ductus nasopalatinus* (Rodolfo-Masera 1943) liegender Neuroepithelbereich, der bei Mäusen etwa 10.000 ziliäre sensorische Neurone beherbergt. Bezogen auf die neuronale Rezeptorausstattung und die bislang beschriebenen Signalmechanismen ähneln die Zellen des Septalorgans weitgehend

den hauptolfaktorischen Neuronen. Allerdings unterscheiden sich beide Zelltypen fundamental in der Variabilität individueller Rezeptorexpressionsmuster. So wird in der überwältigenden Mehrheit (>90%) der Septalorganneurone je ein Mitglied einer Gruppe von lediglich neun Rezeptortypen monogen exprimiert [65]. Der bei Weitem häufigste Vertreter dieser Gruppe ist SR1, ein Rezeptor, den ca. 50 % aller Neurone des Septalorgans exprimieren. In physiologischen Studien genetisch veränderter Mäuse zeigt SR1 ein ungewöhnlich breites und über einen weiten Konzentrationsbereich stabiles Duftreaktionsprofil [19]. Angesichts der gleichzeitig beobachteten Mechanosensitivität der Septalorganneurone [17][18] wird derzeit eine mögliche Funktion des Septalorgans als strategisch platzierter „Vorposten“ des hauptolfaktorischen Neuroepithels diskutiert. Dieser könnte z.B. allgemeine Veränderungen der physikochemischen Umgebungsparameter (Luftströmung, etc.) detektieren und so eine situationsabhängige generelle Sensitivitätsjustierung des hauptolfaktorischen Systems einleiten.

Ähnlich dem Septalorgan hat auch das Grüneberg-Ganglion [19] vor einigen Jahren ein „Comeback“ in der neurosensorischen Forschung erlebt. Die Somata der GG-Zellen liegen bilateral im dorsorostralen Bereich der Nasenhöhle und somit in unmittelbarer Nähe zur Nasenöffnung. Jedes Ganglion umfasst ca. 300–500 Zellen, deren Axone entlang des dorsalen Dachs der Nasenhöhle zu dorsokaudalen Regionen des *Bulbus olfactorius* projizieren. Das Zielareal der GG-Zellen überlappt in Teilen mit der Bulbusregion, in der die sog. „Necklace“ Glomeruli liegen, die ihrerseits von GC-D-exprimierenden Neuronen innerviert werden. Wie kanonische olfaktorische Neurone, TAAR- und GC-D-exprimierende Neurone, Vomeronasal- und Septalorganneurone, zeigen auch GG-Zellen die charakteristische Expression des olfaktorischen Markerproteins (OMP; [37]). Allerdings scheinen GG-Zellen keinen direkten Zugang zum Lumen der Nasenhöhle zu besitzen. Lichtmikroskopisch lassen sich keine eindeutigen Zellfortsätze, wie etwa Dendriten, Zilien oder Mikrovilli ausmachen. Mit Hilfe rasterelektronenmikroskopischer Aufnahmen konnten Brechbühl et al. [3] jedoch vor Kurzem zeigen, dass GG-Neuronen der Maus primäre Zilien tragen, die theoretisch von wasserlöslichen chemischen Stimuli über eine permeable Keratinschicht erreicht werden könnten. Die selben Autoren berichten ebenfalls von transienten zytosolischen Ca^{2+} -Anstiegen in GG-Neuronen als Reaktion auf unter Stress sezernierte chemische Substanzen, die Artgenossen potentielle Ge-

fahren signalisieren. Die molekulare Identität solcher „Alarmpheromone“ bleibt allerdings weiterhin unklar.

Das Vomeronasalorgan – „Spielgestalter“ sozialer Kommunikation

Die klassische Unterscheidung olfaktorischer Subsysteme trennt zwischen hauptolfaktorischem und vomeronasalem System, dessen periphere sensorische Struktur – das VNO – erstmals von Ludvig L. Jacobson im Jahr 1813 beschrieben wurde. Das VNO besteht aus zwei bilateral symmetrischen, blind endenden, zigarrenförmigen Röhren, die eingebettet in den Vomerknochen am antero-basalen Septum liegen. In coronaler Ansicht bilden die vomeronasalen Neurone medial ein halbmondförmiges sensorisches Epithel. Jedes bipolare VNO Neuron entsendet einen einzelnen apikalen Dendriten, dessen Mikrovilli tragende Endigung (*knob*) Kontakt zum Lumen des VNO hat. Die *knobs* sind von einer Schleimschicht (*Mucus*) bedeckt, die von vomeronasalen Drüsen sezerniert wird. Bei unmittelbarem Kontakt mit einer potentiellen Pheromonquelle gelangen die meist wasserlöslichen Stimuli durch autonom kontrollierte pulsatile Kontraktionen eines großen lateralen Blutgefäßes [26] in das VNO-Lumen. Durch diesen Mechanismus können auch nichtflüchtige makromolekulare Signale aus Urindepots, Vaginal- und Duftdrüsensekreten oder Speichel aufgenommen werden [29].

Innerhalb des Vomeronasalsystems lassen sich mindestens zwei topographisch voneinander getrennte, neuronale Subpopulationen mit unterschiedlicher Rezeptorausstattung unterscheiden (Abb. 2). So exprimieren VNO Neurone in der apikalen Schicht des sensorischen Epithels $G_{\alpha 2}$ in Kombination mit je einem Mitglied der V1R Multigenfamilie, die insgesamt ~150 intakte GPCR Gene umfasst [13][52]. Wie bei Riechrezeptoren weisen die V1R-kodierenden Regionen keine Introns auf, sind in genomischen Clustern lokalisiert und werden streng monoallel exprimiert [53]. Allerdings zeigen Riechrezeptoren und V1R Gene keine signifikanten Sequenzhomologien. Daraus abgeleitete Hoffnungen auf eine erleichterte rekombinante Expression der V1R Proteine wurden bislang jedoch enttäuscht. Lediglich einem Rezeptor der V1R-Familie (V1Rb2; [2]) konnte bisher ein spezifischer Ligand zugeordnet werden. Dennoch sprechen alle derzeit vorliegenden Befunde für eine chemosensorische Funktion der V1R Rezeptoren. Unter anderem zeigen Mäuse, denen ein für 16 V1R-Proteine kodierender Gen-Cluster fehlt [12], ausgeprägte



Anomalien in ihrem Sozial- und Sexualverhalten.

Neurone der basalen G_{α} -positiven Zone exprimieren Mitglieder der V2R-Rezeptorfamilie, die, als GPCRs der Klasse C, keinerlei nennenswerte Sequenzhomologien zu den V1R Rezeptorgenen aufweisen [38][54]. Kennzeichnend für alle ~120 putativ funktionalen V2R Rezeptorproteine [68] ist die ausgeprägte, aminoterminal Extrazellulärdomäne, deren Sequenz Ähnlichkeiten mit metabotropen Glutamat- und

T1R-Geschmacksrezeptoren (süß/umami) aufweist. Aufgrund dieser Homologien wird angenommen, dass die Bindestelle für V2R-Liganden innerhalb der extrazellulären Domäne lokalisiert ist [42].

Wir gehen heute davon aus, dass sowohl V1R-, als auch V2R-Rezeptoren von einer Gruppe strukturell unterschiedlicher semi-chemischer Substanzen aktiviert werden, die in ihrer Gesamtheit oft als Pheromone bezeichnet werden – ein Begriff, dessen Definition derzeit erneut diskutiert wird [5]

[62]. Die Signifikanz der Pheromone und vergleichbarer sozialer Signale manifestiert sich in ihrer Funktion als molekulare „Schalter“, deren Detektion automatisch ein genetisch prädestiniertes Verhalten auslöst und / oder direkt den hormonellen Haushalt des Rezipienten kontrolliert. Dabei beeinflussen Pheromone so bedeutende Verhaltenseigenschaften wie Partnerwahl, Territorial- und Aggressionsverhalten. Typischerweise sind pheromonartige Substanzen in komplexen Körpersekreten (z. B. Urin, Schweiß) enthalten. Ihre Struktur reicht von kleinen, volatilen Molekülen [28][50], über Steroide [46], bis hin zu komplexen Peptiden [26] [29][31] und Proteinen [9]. Eine strikte Kategorisierung des VNO als spezialisierter Pheromondetektor wäre jedoch simplistisch [49][60].

Wesentliche Aspekte der Funktion von V1/2R Rezeptoren sowie der nachgeschalteten Signaltransduktionswege sind noch weitgehend unverstanden. Aufgrund der zonenspezifischen Koexpression bestimmter G-Proteine stellen $G_{\alpha_{i2}}$ - bzw. G_{α} -abhängige Signalwege in apikalen bzw. basalen Neuronen ein attraktives Modell dar. Verhaltensexperimente in Knockout-Tieren ergaben jedoch bislang keine Hinweise, die diese Hypothese stützen [47][64]. Ein deutlich besserer Konsens besteht hinsichtlich der Rolle der Phospholipase C (PLC). Die primären Produkte dieses Enzyms - Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP3) und Diacylglycerol (DAG) - werden mit der Aktivierung eines Ca^{2+} -permeablen Transduktionskanals in Verbindung gebracht [61]. Bemühungen, diesen Kanal zu identifizieren, konzentrierten sich bisher hauptsächlich auf einen Vertreter der TRP-Kanalfamilie: TRPC2 [34]. $TRPC2^{-/-}$ Mäuse weisen in ihrem Sozial- und Sexualverhalten gravierende Defizite auf. Allerdings zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen genetischer $TRPC2$ -Deletion und chirurgischer Ablation des VNO [24]. Ein DAG-aktivierter $TRPC2$ -abhängiger Strom wird innerhalb der primären vomeronasalen Signaltransduktion aktiviert [35]. Darüber hinaus spielt dieser Strom auch eine wichtige Rolle bei der Adaptation sensorischer Antworten im VNO [59]. Wahrscheinlich vermittelt der gleiche Kanal auch den initialen Einstrom von Ca^{2+} , der einen kürzlich beschriebenen Ca^{2+} -aktivierten Cl^{-} -Strom aktivieren könnte. Ein so induzierter Cl^{-} -Efflux würde die Rezeptorvermittelte Membrandepolarisation zusätzlich verstärken [67].

Verglichen mit der Fülle von Detailinformationen über die Signaltransduktion in kanonischen olfaktorischen Neuronen sind unsere derzeitigen Modellvorstellungen von der sensorischen Signalverarbeitung im VNO

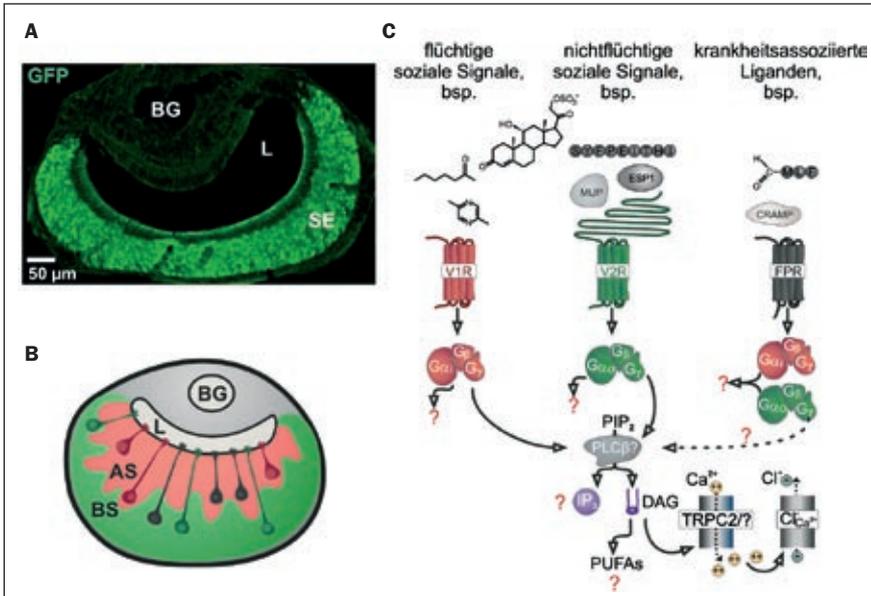


Abb. 2: Gewebearchitektur und putative Signaltransduktionswege im VNO der Maus. **A:** Konfokalmikroskopische Aufnahme eines coronalen VNO Kryoschnittes. Differenzierte vomeronasale Neurone exprimieren ein grün fluoreszierendes Protein (GFP) unter der Kontrolle der Promotorsequenz des für das olfaktorische Markerprotein (OMP) kodierenden Gens. SE Sensorisches Epithel, L Lumen, BG Blutgefäß. **B:** Schematische Darstellung des vomeronasalen Systems in coronaler Ansicht. Das sensorische Neuroepithel lässt sich in eine apikale (AS) und eine basale Schicht (BS) einteilen. **C:** In den Mikrovilli der dendritischen Endigungen der VNO-Neurone induziert Rezeptor-Liganden-Interaktion eine komplexe biochemische Signalkaskade zur Umwandlung des chemischen Bindungssignals in elektrische Impulse (Signaltransduktion). Flüchtige niedermolekulare Substanzen (z. B. 2-Heptanon oder 2,5-Dimethylpyrazin) aktivieren V1R-/ $G_{\alpha_{i2}}$ -exprimierende Neurone der apikalen Epithelschicht, während V2R-/ G_{α} -positive Neurone der basalen Schicht wahrscheinlich durch nichtflüchtige Makromoleküle, wie z. B. MUPs („major urinary proteins“), ESPs („exocrine gland secreting peptides“) oder MHC („major histocompatibility complex“) Peptide der Klasse I (z. B. SYF-PEITHI) stimuliert werden. Auch sulfatierte Steroide (z. B. Corticosteron-21-Sulfat) wurden als potente vomeronasale Stimuli beschrieben, wobei die Identität der von diesen Liganden aktivierten Rezeptoren noch unklar ist. FPR-rs-exprimierende Neurone werden durch Pathogen- oder Entzündungs-assoziierte Liganden wie z.B. das Formylpeptid fMLF aktiviert. Die genaue Funktion der verschiedenen koexprimierten G-Protein α -Untereinheiten ($G_{\alpha_{i2}}$ und G_{α}) ist derzeit offen. Anhand pharmakologischer Hinweise scheint jedoch die $G_{\beta/\gamma}$ -abhängige Aktivierung der Phospholipase C (PLC) eine Schlüsselrolle in der vomeronasalen Signaltransduktion einzunehmen. Dieses membranständige Enzym spaltet Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in Inositol-1,4,5-trisphosphate (IP₃) und Diacylglycerol (DAG), wobei die DAG-abhängige Öffnung von TRPC2 Ionenkanälen eine zentrale Transduktionsfunktion auszuüben scheint. Die Rolle der kürzlich im VNO beschriebenen Ca^{2+} -abhängigen Cl^{-} -Kanäle sowie die Funktion mehrfach ungesättigter Fettsäuren (polyunsaturated fatty acids, PUFAs), die ebenfalls Ca^{2+} -Signale in VNO Neuronen induzieren, sind bislang noch kaum verstanden.

noch bruchstückhaft. Angesichts der herausragenden biologischen Bedeutung intraspezifischer sozialer Kommunikation, konzentriert sich die Forschung in meinem Labor auf die Aufklärung physiologischer Konzepte, die innerartlicher chemischer Kommunikation im Mausmodell zugrundeliegen. Detaillierte Einblicke in die neuronalen Funktionsmechanismen, die Chemosensorik und Sozialverhalten miteinander verknüpfen, sind dabei unser langfristiges Forschungsziel.

Homöostatische Plastizität in vomeronasalen Neuronen

Um die komplexen zellulären Signalprozesse, die im Kontext der Pheromonwahrnehmung ablaufen, besser zu verstehen, haben wir vor Kurzem eine genomweite Hochdurchsatz-Analyse vomeronasaler Transkripte durchgeführt, um aktivitätsabhängig regulierte Gene im VNO aufzuspüren. Unser Ziel war, ein Analyseparadigma zu entwickeln, das verschiedene Ebenen der Genexpressionsuntersuchung integriert (Abb. 3). Der von uns gewählte Ansatz kombiniert Microarray-basierte quantitative Transkriptanalysen mit konventionell-qualitativen RT-PCR Nachweisen und semi-quantitativer Immunzytochemie [20]. Analog der vor allem in mit Lernen und Gedächtnis assoziierten Hirnarealen beschriebenen homöostatischen Plastizität [11][66], gingen wir von der grundlegenden Hypothese aus, dass der dynamische Bereich der Input-Output Relation vomeronasaler Neurone einer stetigen aktivitätsabhängig regulierten Feinjustierung unterliegt. Kompensatorische Feedback-Regulation der de novo Proteinsynthese (über Stunden bis hin zu mehreren Tagen) stellt eine entscheidende Stellschraube im Kontext solcher nicht Hebb'scher Plastizitätsmechanismen dar [69] und spiegelt daher den zeitlichen Rahmen des von uns etablierten Reizdeprivationsmodells wider (Abb. 3).

Aufgrund ihrer Schlüsselrolle als bestimmende Faktoren der Membranerregbarkeit ist eine gerichtete Modulation der Expressionsdichte spannungsabhängiger K^+ -Kanäle in diesem Zusammenhang von besonderer Bedeutung [27]. Durch den systematischen Vergleich vomeronasaler K^+ -Kanaltranskriptionslevel in stimulierten versus reizdeprivierten Tieren konnten wir einen in stimulierten Mäusen signifikant stärker exprimierten Kanal identifizieren: mERG1. Als Mitglied der *ether-à-go-go* related gene (ERG) Kanalfamilie kennzeichnet mERG1 vor allem ein unkonventionelles Schaltverhalten (langsame Aktivierung, schnelle Inaktivierung). hERG, humanes Homolog von mERG1 und Gründungs-vater der Kanalfamilie, gehört aufgrund des schwerwiegenden kardialen Phänotyps

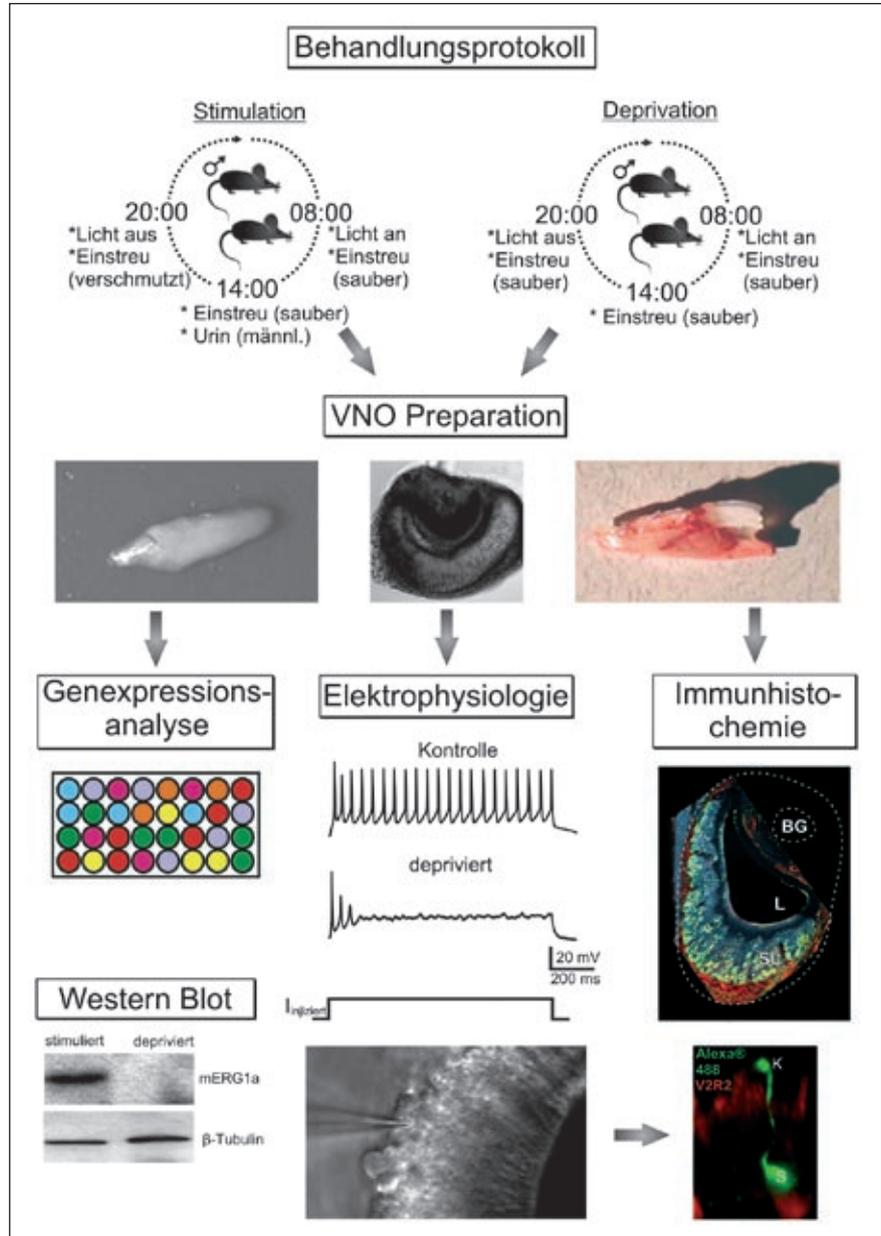


Abb. 3: Illustration unseres experimentellen Ansatzes zur Untersuchung aktivitätsabhängiger Expressionsprofile im VNO. Ziel dieser Analysen war die Identifikation von Ionenkanalproteinen, die an homöostatischer Plastizität und damit an der aktivitätsabhängigen Aufrechterhaltung vomeronasaler Output-Stabilität beteiligt sind. Oben Schematische Darstellung der experimentellen Strategie zur Pheromonexposition (links) bzw. Reizdeprivation (rechts) isoliert gehaltener männlicher C57Bl/6 Mäuse. Mitte Typische VNO-Präparationen für die GeneChip®-basierte Charakterisierung von Genexpressionsprofilen (links), für Patch-Clamp Messung elektrischer Aktivität in akuten Schnitten (mitte) sowie für immunhistochemische Untersuchungen an Kryoschnitten (rechts). Unten Semiquantitative Western Blot Analysen zeigen eine erhöhte Expression vomeronasaler ERG1a Kanäle in stimulierten Mäusen. β -Tubulin dient als Beladungskontrolle (links). Lichtmikroskopische Aufnahme (Differentieller Interferenzkontrast, DIC) eines vomeronasalen, über eine Patch-Pipette mit Alexa[®]488 beladenen Neurons. Dieser Ansatz erlaubt die Färbung von VNO Neuronen während elektrophysiologischer Messungen (Mitte). Nachfolgend kann die molekulare Identität des abgeleiteten Neurons über post-hoc Immunzytochemie gegen zonenspezifische Markerproteine (z. B. V2R2; rechts) bestimmt werden. SE Sensorisches Epithel, L Lumen, BG Blutgefäß, K knob, S Soma

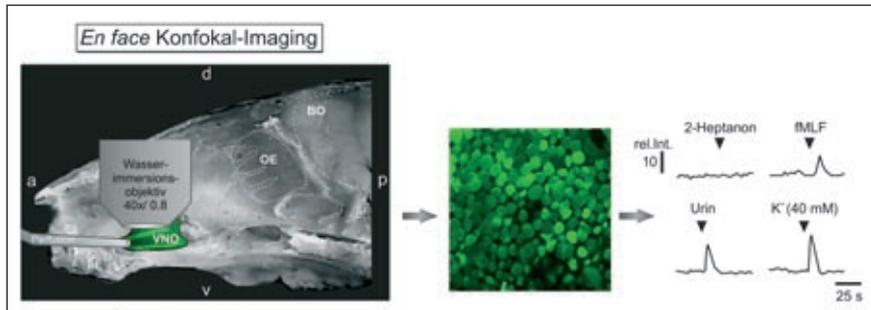


Abb. 4: Formylpeptide induzieren Ca^{2+} -Signale in dendritischen Endigungen vomeronasaler Neurone. Oben Überlagerung makroskopischer Hellfeld- und Fluoreszenzaufnahmen des rostralen Kopfbereichs einer präparierten OMP-GFP-Maus zur Illustration der kürzlich von uns etablierten „en face“ Ca^{2+} -Imaging Methode. Unten Konfokalmikroskopische Abbildung der dendritischen Oberfläche von fluo-4/AM-markierten Neuronen bei 400x Vergrößerung (links). Repräsentative Originalmessungen zytosolischer Ca^{2+} -Signale nach Applikation von 2-Heptanon (1 μM), fMLF (900 nM), verdünntem Mausurin (1:500) und einer erhöhten extrazellulären K^+ -Konzentrationen (40 mM; rechts).

im Zuge erblicher oder pharmakologischer Kanalopathien (langes QT-Syndrom) zu den am intensivsten erforschten Ionenkanälen [55][57]. Im Gegensatz dazu ist die physiologische Rolle von ERG-Kanälen im zentralen wie peripheren Nervensystem kaum verstanden [56]. Mit Hilfe immunhistochemischer Methoden konnten wir nachweisen, dass mERG1 Kanalproteine selektiv in basalen V2R-positiven VNO Neuronen exprimiert werden und, bei Pheromonexposition bzw. -deprivation, einer substantiellen Expressionsregulation unterliegen. Die Interpretation unserer Befunde und deren physiologische Relevanz steht und fällt mit der Frage, ob ein veränderter mERG1 Expressionsgrad auch einen elektrophysiologischen Phänotyp in vomeronasalen Neuronen bedingt. Durch Kombination von *Whole-Cell* Patch-Clamp Ableitungen in akuten VNO Schnittpräparaten mit immunzytochemischen *post-hoc* Doppelfärbungen und anschließender dreidimensionaler Rekonstruktion fluoreszenzmarkierter Neurone, konnten wir einen primär mERG1-vermittelten K^+ -Strom in basalen vomeronasalen Neuronen aufzeichnen und gleichzeitig demonstrieren, dass die Stärke dieses Stroms nach Reizdeprivation signifikant abnimmt. Mittels der sog. Aktionspotentialklemme (AP-Clamp) [1] konnten wir zudem zeigen, dass ERG-Ströme entscheidend an der Repolarisation vomeronasaler Aktionspotentiale beteiligt sind. Infolgedessen führt sowohl die pharmakologische Inhibition der mERG1 Kanäle, als auch deren verminderte Expression nach Reizdeprivation zu substantiellen Störungen des neuronalen Outputs.

Zusammengefasst zeigen unsere Befunde erstmalig ein Beispiel für homöostatische Plastizität in der Peripherie des akzessorischen olfaktorischen Systems. Basale VNO Neu-

rone sind durch aktivitätsabhängige Regulation der mERG1 Expressionsdichte in der Lage, die dynamische Breite ihrer individuellen Input-Output Funktion zu kontrollieren und bedarfsabhängig anzupassen [20].

Vomeronasale Chemorezeptoren: Entdeckung einer dritten Familie

Angesichts der Diversität neuronaler Subpopulationen im hauptolfaktorischen Epithel lag die Hypothese nahe, dass auch im VNO noch nicht identifizierte Sinneszellpopulationen mit entsprechend unbekanntem Chemorezeptoren existieren könnten. In enger Zusammenarbeit mit der Gruppe des Neurogenetikers Ivan Rodriguez von der Universität Genf entwickelten wir eine Screening-Strategie für die Suche nach putativ funktionalen, jedoch bislang unentdeckten Rezeptoren im vomeronasalen System der Maus. Wir erwarteten, dass solche Rezeptorproteine die charakteristischen Merkmale aller bis dato identifizierten chemosensorischen GPCRs aufweisen würden. Demnach suchten wir nach Proteinen mit (a) heptahelikaler Transmembrantopologie, (b) punktuelltem Expressionsmuster im vomeronasalen Neuroepithel, (c) exklusiver Expression-Vertreter anderer Chemorezeptorfamilien betreffend - und (d) monogener Expression-Mitglieder der eigenen Rezeptorfamilie betreffend - sowie (e) Lokalisation in den dendritischen Endigungen der VNO Neurone und (f) sensorischer Aktivierung nach Interaktion mit biologisch relevanten Stimuli.

Auf Basis spezifischer Oligonukleotid-Primer gegen etwa 100 Kandidatengene führten wir RT-PCR-basierte Transkriptionsanalysen in vomeronasalen Gewebeproben

der Maus durch [51]. Dabei identifizierten wir insgesamt fünf GPCR-Gene [Kriterium (a)], die weder zur Familie der V1R, noch zur Gruppe der V2R Gene gehörten, sondern allesamt Mitglieder der Familie der Formylpeptidrezeptor (FPR)-ähnlichen Gene waren (Fpr-rs1, rs3, rs4, rs6 und rs7). Die einzelnen Transkripte erwiesen sich in nachfolgenden quantitativen PCR Studien in der Tat als hochgradig VNO-spezifisch. Sowohl *in-situ* Hybridisierungsexperimente (FPR-rs1-7), als auch immunzytochemische Färbungen (FPR-rs3) illustrierten ein punktuelltes Expressionsmuster einerseits [Kriterium (b)], sowie gezielte Proteintranslokation in die mikrovillären dendritischen Endigungen der Neurone andererseits [Kriterium (e)]. Darüber hinaus gelang es uns, sowohl exklusive [Kriterium (c)], als auch monogene [Kriterium (d)] FPR-rs Expression in einzelnen VNO Neuronen nachzuweisen. Interessanterweise beschränkt sich die Expression der FPR-rs-Proteine, FPR-rs1 ausgenommen, auf Neurone der apikalen $G_{\alpha 2}$ -exprimierenden Schicht.

Immunzellen wie z.B. Granulozyten oder Makrophagen exprimieren FPR1 und FPR-rs2, zwei FPR-Proteine, die nach unseren Erkenntnissen nicht in vomeronasalen Zellen transkribiert werden. Beide Rezeptoren weisen ungewöhnlich breite rezeptive Felder auf, deren individuelle Ligandenspektren eher aufgrund der immunologischen Funktion eines Agonisten, als durch dessen strukturelle Eigenschaften definiert werden [10][41]. Zu diesen FPR-Liganden zählen Derivate bestimmter Pathogene (wie z.B. fMLF, das prototypische Formylpeptid Gram-negativer Bakterien) oder an akuten Entzündungsreaktionen beteiligte Peptide/Lipide (wie z.B. die antimikrobiell wirkenden Moleküle CRAMP und Lipoxin A4). Da für die VNO-spezifischen Rezeptoren FPR-rs3, rs4, rs6 und rs7 noch keine Liganden beschrieben waren, klonierten wir entsprechende Expressionskonstrukte für die rekombinante Charakterisierung der FPR-rs Rezeptorproteine in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293). Überraschenderweise zeigten die VNO-spezifischen FPR-rs-Proteine dabei ähnlich breite und teils überlappende Ligandenprofile wie ihre verwandten Immunsystemrezeptoren.

Lassen sich die Ergebnisse unserer heterologen Expressionsstudien auf die *in-vivo*-Situation übertragen? Anders formuliert, aktivieren pathogen- bzw. entzündungsassoziierte Moleküle tatsächlich vomeronasale Neurone? Um diese Frage zu beantworten etablierten wir einen neuartigen *in-situ* Ansatz zur Durchführung sensorischer Echtzeit-Aktivitätsmessungen

in intakten vomeronasalen Neuronen (Abb. 4). Die konfokalmikroskopische Darstellung fluoreszierender Ca^{2+} -Reporterfarbstoffe in den dendritischen Endigungen einzelner VNO Neurone im *Whole-Mount* Präparat erlaubt die experimentelle Untersuchung vomeronasaler Signale bei nahezu intakter Epithelstruktur und weitgehend erhaltener axonaler Projektion. In den so von uns durchgeführten Experimenten gelang es, konzentrationsabhängige Ca^{2+} -Signale nach Applikation rekombinant beschriebener FPR-rs Agonisten zu messen [Kriterium (f)]. Dieser spannende Befund legt die Vermutung nahe, dass FPR-rs-exprimierende vomeronasale Neurone eine neuartige Population chemosensorischer Rezeptorzellen darstellen.

Welche physiologische Funktion könnten diese Zellen ausüben? Bereits seit einiger Zeit wissen wir, dass Mäuse über ihren Geruchssinn Pathogene oder den Gesundheitszustand von Artgenossen erkennen können [23]. Bisher konnte jedoch bei Säugetieren keinem der bekannten olfaktorischen Subsysteme eine Funktion bei der Detektion von Pathogenen oder Krankheitszuständen zugeordnet werden [44]. Da FPR-rs Agonisten während verschiedener Krankheitsstadien in diversen Körperflüssigkeiten sezerniert werden [8], könnten unsere Daten beispielsweise erklären, wie Tiere gesunde potenzielle Partner von kranken Artgenossen unterscheiden.

Danksagung

Unsere Forschungsarbeiten werden aktiv unterstützt durch das Emmy Noether-Programm der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SP724/2–1), die Mercator Stiftung (Junges Kolleg) und die VolkswagenStiftung (Lichtenberg-Professur).

Literatur

- Bean BP (2007) The action potential in mammalian central neurons. *Nat Rev Neurosci* 8:451-465 [1]
- Boschat C, Pelofi C, Randin O et al. (2002) Pheromone detection mediated by a V1r vomeronasal receptor. *Nat Neurosci* 5:1261-1262 [2]
- Brechbuhl J, Klaey M, Broillet MC (2008) Grueberganglion cells mediate alarm pheromone detection in mice. *Science* 321:1092-1095 [3]
- Breer H, Fleischer J, Strotmann J (2006) The sense of smell: multiple olfactory subsystems. *Cell Mol Life Sci* 63:1465-1475 [4]
- Brennan PA, Zufall F (2006) Pheromonal communication in vertebrates. *Nature* 444:308-315 [5]
- Buck LB (2000) The molecular architecture of odor and pheromone sensing in mammals. *Cell* 100:611-618 [6]
- Buck L, Axel R (1991) A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell* 65:175-187 [7]
- Casella R, Shariat SF, Monoski MA et al. (2002) Urinary levels of urokinase-type plasminogen activator and its receptor in the detection of bladder carcinoma. *Cancer* 95:2494-2499 [8]
- Chamero P, Marton TF, Logan DW et al. (2007) Identification of protein pheromones that promote aggressive behaviour. *Nature* 450:899-902 [9]
- Chromek M, Slamova Z, Bergman P et al. (2006) The antimicrobial peptide cathelicidin protects the urinary tract against invasive bacterial infection. *Nat Med* 12:636-641 [10]
- Davis GW (2006) Homeostatic control of neural activity: from phenomenology to molecular design. *Annu Rev Neurosci* 29:307-323 [11]
- Del Punta K, Leinders-Zufall T, Rodriguez I et al. (2002) Deficient pheromone responses in mice lacking a cluster of vomeronasal receptor genes. *Nature* 419:70-74 [12]
- Dulac C, Axel R (1995) A novel family of genes encoding putative pheromone receptors in mammals. *Cell* 83:195-206 [13]
- Firestein S (2001) How the olfactory system makes sense of scents. *Nature* 413:211-218 [14]
- Fulle HJ, Vassar R, Foster DC et al. (1995) A receptor guanylyl cyclase expressed specifically in olfactory sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:3571-3575 [15]
- Gibson AD, Garbers DL (2000) Guanylyl cyclases as a family of putative odorant receptors. *Annu Rev Neurosci* 23:417-439 [16]
- Grosmaître X, Santarelli LC, Tan J et al. (2007) Dual functions of mammalian olfactory sensory neurons as odor detectors and mechanical sensors. *Nat Neurosci* 10:348-354 [17]
- Grosmaître X, Fuss SH, Lee AC et al. (2009) SRI, a mouse odorant receptor with an unusually broad response profile. *J Neurosci* 29:14545-14552 [18]
- Gruneberg H (1973) A ganglion probably belonging to the N. terminalis system in the nasal mucosa of the mouse. *Z Anat Entwicklungsgesch* 140:39-52 [19]
- Hagendorf S, Fluegge D, Engelhardt C, Spehr M (2009) Homeostatic control of sensory output in basal vomeronasal neurons: activity-dependent expression of ether-a-go-go-related gene potassium channels. *J Neurosci* 29:206-221 [20]
- Hu J, Zhong C, Ding C et al. (2007) Detection of near-atmospheric concentrations of CO_2 by an olfactory subsystem in the mouse. *Science* 317:953-957 [21]
- Juilfs DM, Soderling S, Burns F et al. (1999) Cyclic GMP as substrate and regulator of cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs). *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 135:67-104 [22]
- Kavaliers M, Choleris E, Pfaff DW (2005) Genes, odours and the recognition of parasitized individuals by rodents. *Trends Parasitol* 21:423-429 [23]
- Kelliher KR, Spehr M, Li XH et al. (2006) Pheromonal recognition memory induced by TRPC2-independent vomeronasal sensing. *Eur J Neurosci* 23:3385-3390 [24]
- Keverne EB (2002) Mammalian pheromones: from genes to behaviour. *Curr Biol* 12:R807-R809 [25]
- Kimoto H, Sato K, Nodari F et al. (2007) Sex- and strain-specific expression and vomeronasal activity of mouse ESP family peptides. *Curr Biol* 17:1879-1884 [26]
- Lai HC, Jan LY (2006) The distribution and targeting of neuronal voltage-gated ion channels. *Nat Rev Neurosci* 7:548-562 [27]
- Leinders-Zufall T, Lane AP, Puche AC et al. (2000) Ultrasensitive pheromone detection by mammalian vomeronasal neurons. *Nature* 405:792-796 [28]
- Leinders-Zufall T, Brennan P, Widmayer Pet al (2004) MHC class I peptides as chemosensory signals in the vomeronasal organ. *Science* 306:1033-1037 [29]
- Leinders-Zufall T, Cockerham RE, Michalakis S et al (2007) Contribution of the receptor guanylyl cyclase GC-D to chemosensory function in the olfactory epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:14507-14512 [30]
- Leinders-Zufall T, Ishii T, Mombaerts P et al (2009) Structural requirements for the activation of vomeronasal sensory neurons by MHC peptides. *Nat Neurosci* 12:1551-1558 [31]
- Lewcock JW, Reed RR (2004) A feedback mechanism regulates monoallelic odorant receptor expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:1069-1074 [32]
- Liberles SD, Buck LB (2006) A second class of chemosensory receptors in the olfactory epithelium. *Nature* 442:645-650 [33]
- Liman ER, Corey DP, Dulac C (1999) TRP2: a candidate transduction channel for mammalian pheromone sensory signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:5791-5796 [34]
- Lucas P, Ukhanov K, Leinders-Zufall T, Zufall F (2003) A diacylglycerol-gated cation channel in vomeronasal neuron dendrites is impaired in TRPC2 mutant mice: mechanism of pheromone transduction. *Neuron* 40:551-561 [35]
- Malnic B, Hirono J, Sato T, Buck LB (1999) Combinatorial receptor codes for odors. *Cell* 96:713-723 [36]
- Margolis FL (1982) Olfactory marker protein (OMP). *Scand J Immunol Suppl* 9:181-199 [37]
- Matsunami H, Buck LB (1997) A multigene family encoding a diverse array of putative pheromone receptors in mammals. *Cell* 90:775-784 [38]
- McClintock TS, Sammeta N (2003) Trafficking prerogatives of olfactory receptors. *Neuroreport* 14:1547-1552 [39]
- Meyer MR, Angele A, Kremmer E et al (2000) A cGMP-signaling pathway in a subset of olfactory sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:10595-10600 [40]
- Migeotte I, Communi D, Parmentier M (2006) Formyl peptide receptors: a promiscuous subfamily of G protein-coupled receptors controlling immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev* 17:501-519 [41]
- [42]Mombaerts P (2004) Genes and ligands for odorant, vomeronasal and taste receptors. *Nat Rev Neurosci* 5:263-278
- [43]Mombaerts P, Wang F, Dulac C et al (1996) Visualizing an olfactory sensory map. *Cell* 87:675-686
- Munger SD (2009) Olfaction: noses within noses. *Nature* 459:521-522 [44]



- Munger SD, Leinders-Zufall T, Zufall F (2009) Subsystem organization of the mammalian sense of smell. *Annu Rev Physiol* 71:115-140 [45]
- Nodari F, Hsu FF, Fu X et al. (2008) Sulfated steroids as natural ligands of mouse pheromone-sensing neurons. *J Neurosci* 28:6407-6418 [46]
- Norlin EM, Gussing F, Berghard A (2003) Vomeronasal phenotype and behavioral alterations in G alpha i2 mutant mice. *Curr Biol* 13:1214-1219 [47]
- Pankevich DE, Baum MJ, Cherry JA (2004) Olfactory sex discrimination persists, whereas the preference for urinary odors from estrous females disappears in male mice after vomeronasal organ removal. *J Neurosci* 24:9451-9457 [48]
- Restrepo D, Arellano J, Oliva AM et al. (2004) Emerging views on the distinct but related roles of the main and accessory olfactory systems in responsiveness to chemosensory signals in mice. *Horm Behav* 46:247-256 [49]
- Restrepo D, Lin W, Salcedo E et al. (2006) Odor-types and MHC peptides: Complementary chemosignals of MHC haplotype? *Trends Neurosci* 29:604-609 [50]
- Riviere S, Challet L, Fluegge D et al (2009) Formyl peptide receptor-like proteins are a novel family of vomeronasal chemosensors. *Nature* 459:574-577 [51]
- Rodriguez I, Del Punta K, Rothman A et al. (2002) Multiple new and isolated families within the mouse superfamily of V1r vomeronasal receptors. *Nat Neurosci* 5:134-140 [52]
- Roppolo D, Vollery S, Kan CD et al. (2007) Gene cluster lock after pheromone receptor gene choice. *EMBO J* 26:3423-3430 [53]
- Ryba NJ, Tirindelli R (1997) A new multigene family of putative pheromone receptors. *Neuron* 19:371-379 [54]
- Sanguinetti MC, Jiang C, Curran ME et al. (1995) A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the IKr potassium channel. *Cell* 81:299-307 [55]
- Sanguinetti MC, Tristani-Firouzi M (2006) hERG potassium channels and cardiac arrhythmia. *Nature* 440:463-469 [56]
- Schwarz JR, Bauer CK (2004) Functions of erg K⁺ channels in excitable cells. *J Cell Mol Med* 8:22-30 [57]
- Serizawa S, Miyamichi K, Nakatani H et al (2003) Negative feedback regulation ensures the one receptor-one olfactory neuron rule in mouse. *Science* 302:2088-2094 [58]
- Spehr J, Hagendorf S, Weiss J et al (2009) Ca²⁺-calmodulin feedback mediates sensory adaptation and inhibits pheromone-sensitive ion channels in the vomeronasal organ. *J Neurosci* 29:2125-2135 [59]
- Spehr M, Munger SD (2009) Olfactory receptors: G protein-coupled receptors and beyond. *J Neurochem* 109:1570-1583 [60]
- Spehr M, Spehr J, Ukhanov K et al (2006) Parallel processing of social signals by the mammalian main and accessory olfactory systems. *Cell Mol Life Sci* 63:1476-1484 [61]
- Stowers L, Marton TF (2005) What is a pheromone? Mammalian pheromones reconsidered. *Neuron* 46:699-702 [62]
- Süskind P (1985) Das Parfum – Die Geschichte eines Mörders. 1. Aufl. *Diogenes, Zürich*, S 107-108 [63]
- Tanaka M, Treloar H, Kalb RG et al. (1999) G(o) protein-dependent survival of primary accessory olfactory neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:14106-14111 [64]
- Tian H, Ma M (2004) Molecular organization of the olfactory septal organ. *J Neurosci* 24:8383-8390 [65]
- Turrigiano GG, Nelson SB (2004) Homeostatic plasticity in the developing nervous system. *Nat Rev Neurosci* 5:97-107 [66]
- Yang C, Delay RJ (2010) Calcium-activated chloride current amplifies the response to urine in mouse vomeronasal sensory neurons. *J Gen Physiol* 135:3-13 [67]
- Young JM, Trask BJ (2007) V2R gene families degenerated in primates, dog and cow, but expanded in opossum. *Trends Genet* 23:212-215 [68]
- Zhang W, Linden DJ (2003) The other side of the engram: experience-driven changes in neuronal intrinsic excitability. *Nat Rev Neurosci* 4:885-900 [69]
- Zhao H, Ivic L, Otaki JM et al. (1998) Functional expression of a mammalian odorant receptor. *Science* 279:237-242 [70]

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. rer. nat. Marc Spehr
 Lichtenberg-Professor für Chemosensorik
 RWTH-Aachen Universität
 Institut für Biologie II /
 Abteilung für Chemosensorik
 Sammelbau Biologie, 42D / R253
 Worringer Weg 1,
 52074 Aachen
 Tel.: +49 241 8020802
 E-Mail: m.spehr@sensorik.rwth-aachen.de
<http://www.sensorik.rwth-aachen.de>

ARTIKEL DES QUARTALS

Vorgestellt von Michael T. Heneka, *Klinische Neurowissenschaften und KFO177, Universität Bonn, Sigmund-Freud-Str. 25, 53127 Bonn*

Formation and maintenance of Alzheimer's disease beta-amyloid plaques in the absence of microglia

Grathwohl, S.A., Kälin, R.E., Bolmont, T., Prokop, S., Winkelmann, G., Kaeser, S.A., Odenthal, J., Radde, R., Eldh, T., Gandy, S., Aguzzi, A., Staufenbiel, M., Mathews, P.M., Wolburg, H., Heppner, F.L. und Jucker, M.

Erschienen in *Nature Neurosciences* 2009 Nov;12(11):1361-3.

Neben den klassischen histopathologischen Merkmalen wie die extrazelluläre Ablagerung von A β und die Bildung intrazellulärer neurofibrillärer Bündel des Tau-Proteins ist die Alzheimerkrankheit auch durch eine

Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten gekennzeichnet. Die Rolle der aktivierten Mikroglia ist seit Längerem zentraler Bestandteil der wissenschaftlichen Diskussion, da es unklar ist, ob sie lediglich einen un-

wesentlichen Nebeneffekt der Pathogenese darstellt oder möglicherweise den Krankheitsverlauf nachhaltig beeinflusst.

Mikrogliazellen repräsentieren die angeborene Immunität des Gehirns. Ihre wesentliche physiologische Aufgabe besteht darin, mit ihren Zellausläufern nahezu alle Bereiche des Gehirns zu überwachen und gegebenenfalls Fremdkörper durch Phagozytose zu entfernen, was durch ihre entwicklungs-geschichtliche Nähe zu den Makrophagen unterstrichen wird. Daher wurde gerade im Fall der Alzheimerkrankheit vermutet, dass Mikrogliazellen, die gehäuft in der Nähe zu amyloiden Plaques zu finden sind, dort am Abbau und der Degradation der extrazellulären Amyloidaggregate beteiligt sind.

In der Novemberausgabe von *Nature Neuroscience* versuchen nun Stefan Grathwohl und Kollegen aus der Arbeitsgruppe von Mathias Jucker in Tübingen in der Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Frank Heppner in Berlin, sich dieser Fragestellung mit einem Monozytenablationsmodell zu nähern.

Die beteiligten Wissenschaftler verwendeten dabei ein murines Modell, in dem ein Herpes-Simplex-Virus-Thymidin-Kinase (HSVTK)/Ganciclovir-System unter Kontrolle des in Monozyten aktiven CD11b-Promotors steht (TK Mäuse). Durch per oraler Gabe von Ganciclovir (GCV) und zusätzlichem wildtype Knochenmarkstransfer, oder durch intrazerebralventrikuläre GCV-Applikation kann in diesem Modell ein selektiver Zelltod CD11b-positiver Mikroglia in der lebenden Maus ausgelöst werden und so, zumindest für eine limitierte Beobachtungszeit, die Konsequenzen einer Ablation dieser Zellpopulation untersucht werden. Diese TK - Mauslinie wurde von Grathwohl und Kollegen in zwei transgene Mausmodelle der Alzheimerkrankheit gekreuzt, um so die Konsequenzen der Mikrogliaablation auf die A β - Ablagerung untersuchen zu können. Die Wissenschaftler entschieden sich, sowohl ein rasch A β ablagerndes (APP/PS1) also auch ein weitaus langsamer ablagerndes Alzheimer-Mausmodell (APP23) zu untersuchen.

Die nachfolgende orale Gabe von Ganciclovir bei fünf Monate alten APP/PS1-Mäusen führte dabei zu einer 30% - Reduktion der Mikrogliazellen im Neokortex. Überraschenderweise konnte unter diesen Bedingungen weder eine Veränderung der Plaquemorphologie noch der Plaquezahl insgesamt festgestellt werden. Da es möglich erschien, dass die verbliebenen Mikrogliazellen den Verlust eines Drittels der eigenen Population kompensieren könnte und daher keine nachhaltige Wirkung auf die Amyloidhistologie nachweisbar war, beschlossen Grathwohl und Kollegen eine stärkere Reduktion der Mikroglia durch eine intrazerebrale Injektion von Ganciclovir zu erzielen. Tatsächlich konnten 90% der Mikrogliazellen nach zwei Wochen Ganciclovirbehandlung eliminiert werden, aber auch dieses Experiment zeigt keine Auswirkung auf die A β - Plauepathologie. Ähnliche Ergebnisse wurden unter Verwendung des weniger aggressiven APP23-Mausmodells im Alter von 17 oder 24 Monaten erzielt. Ebenso überraschend ist, dass keinerlei Veränderung der Plaque-assoziierten dystrophischen Neuriten beobachtet wurde. Grathwohl und Kollegen schlossen daraus, dass auch die pathologischen Veränderungen der Neuriten somit unabhängig von der Aktivierung umliegender Mikrogliazellen entstehen.

Dieses interessante und sehr überraschende Ergebnis zeigt, dass Mikrogliazellen hinsichtlich der Plauepathologie wenig ausrichten können. Der Befund könnte auch daraufhin deuten, dass es bereits sehr

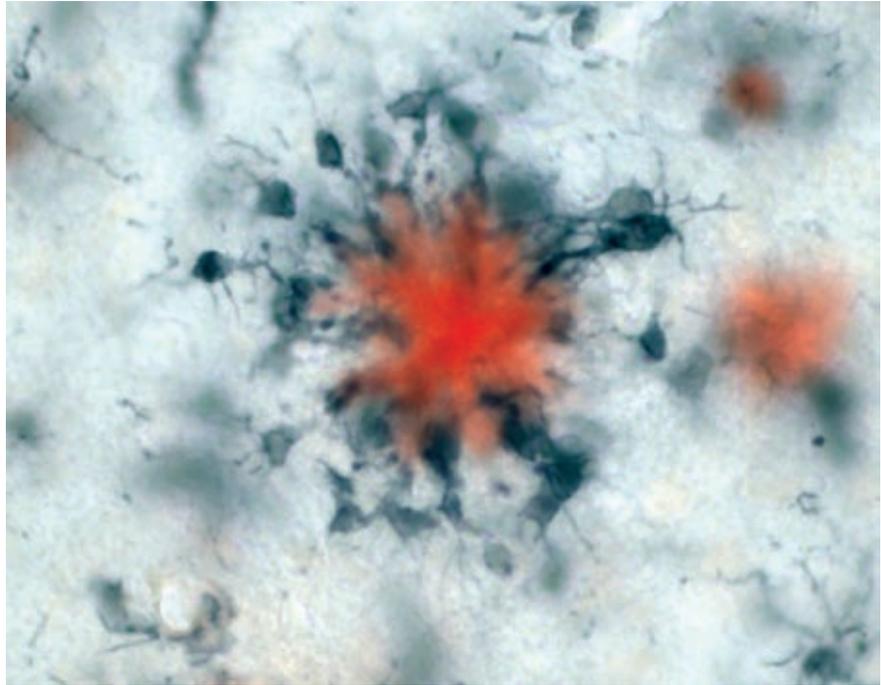


Abb. 1: Plaque umringt von Mikroglia. β -Amyloid-Plaque (Congo Rot Färbung) eng umringt von mehreren Mikrogliazellen (Iba1-Färbung, schwarz) im Neokortex einer APPS1-Maus. Durch diese plaqueumrahmende Position der Zellen ergibt sich die Frage nach deren Funktion in der Alzheimer-Pathogenese.

früh im modellhaften Krankheitsverlauf zu einer funktionellen Paralyse der Mikrogliazellen, zum Beispiel durch toxische A β -Peptide selbst oder proinflammatorische Botenstoffe kommt. Daher könnte es von zentraler Bedeutung sein, gerade diese Mikrogliazellen zu aktivieren, um so der A β -Plauepathologie entgegenzuwirken. Die Hypothese, dass es möglicherweise einer Restimulation der paralyisierten Mikroglia bedarf, um deren Funktionalität wiederherzustellen, wird auch durch Beobachtungen der Arbeitsgruppe von Wisniewski bestärkt, die A β in Mikrogliazellen nur in genau den Alzheimerpatienten nachweisen konnte, die neben ihrer neurodegenerativen Krankheit auch einen ischämischen Schlaganfall erlitten hatten. Was dieser Befund vor dem Hintergrund einer wachsenden Zahl von Mischdemenzen, in denen Zeichen der Amyloid-Pathologie neben denen der zerebralen Ischämie vorliegen, bedeutet, bleibt derzeit offen. Da in ähnlichen transgenen Alzheimer-Tiermodellen gezeigt wurde, dass inflammatorische Ereignisse den A β -Abbau in Tieren unterstützen (Wyss-Coray et al. 2001; Chakrabarty et al. 2010), sollte in Zukunft eine verstärktes Augenmerk auf die frühen inflammatorischen Vorgänge, die bereits vor der Ablagerung von A β auch in transgenen Tieren mit langsamer Ablagerung nachzuweisen sind (Heneka

et al. 2005), gelegt werden. Versuche verschiedener Arbeitsgruppen, die die mikrogliale Phagozytose *in vitro* untersuchten, konnten Oberflächen-Rezeptoren identifizieren, die für die Amyloidaufnahme verantwortlich sind. Interessanterweise konnte auch *in vivo* der Nachweis erbracht werden, dass eine genetische Modifikation solcher Rezeptoren in Mikrogliazellen die A β -Ablagerung verändern können. Eine bislang ungeklärte Frage ist, in welchem Ausmaß diese Rezeptoren in den transgenen Mausmodellen wie im Gehirn von Alzheimerpatienten exprimiert werden und ob ihre Expression möglicherweise negativ durch den Krankheitsverlauf reguliert werden. Sollte es wahr sein, dass die Mikrogliazellen in Zellkultur A β sehr gut phagozytieren, jedoch im lebenden Gehirn diese Eigenschaft nicht besitzen, stellen sie ein umso interessanteres Forschungsobjekt dar, weil geklärt werden muss, auf welche Weise der Zellkulturphänotyp in das „wahre Leben“ umgesetzt werden kann.

Möglich ist aber auch, dass Plaque-assoziierte Mikrogliazellen als verloren anzusehen sind, da sie durch oben beschriebene Prozesse dauerhaft geschädigt werden. Dann wäre der Fokus vielmehr auf die Mikroglia im Bereich synaptischer Verbindungen zu richten, um die bereits beschriebenen, negativen Effekte von A β -

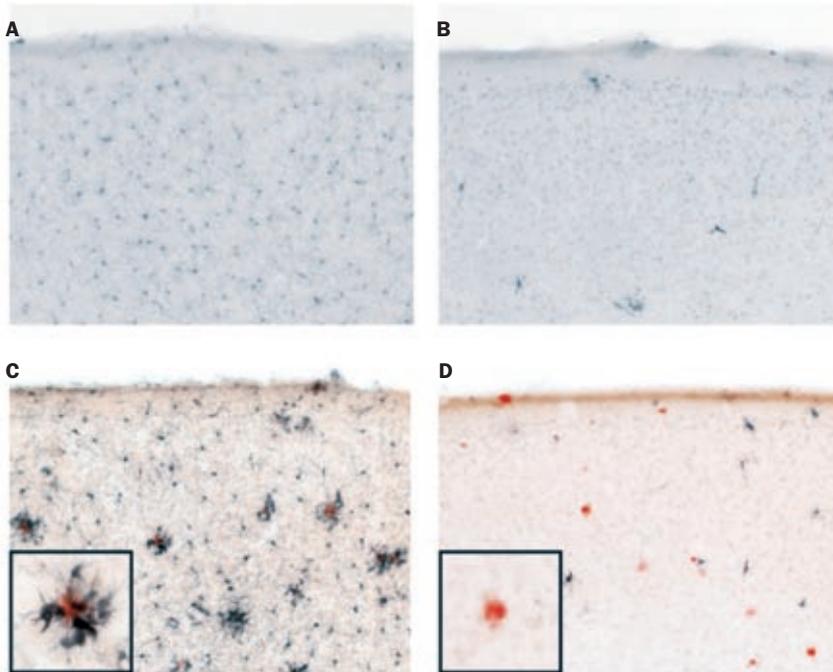


Abb. 2: Ablation von Mikroglia in adulten Mäusen. (A) Mikrogliazellfärbung bei einer Kontrollmaus zeigt eine normale Mikrogliaverteilung im Neokortex während (B) die Mikrogliazellen bei der TK transgenen Maus nach GCV-Behandlung beinahe komplett entfernt wurden (Iba1-Färbung). (C) APPS1-Mäuse zeigen Congo Rot-positive Plaques eng umringt von aktivierten Mikrogliazellen. (D) Nach Entfernen der Mikroglia wurde keine Veränderung der Plaqueanzahl und der Plaquegröße gefunden.

Oligomeren auf die synaptische Signalübertragung näher zu untersuchen. Verschiedene Untersuchungen deuten an, dass Mikroglia eine wichtige physiologische Rolle für die Bildung, Modulation und den Abbau von Synapsen spielt (Bessis et al. 2007; Wake et al. 2009), was nahe legt, dass eine inflammatorische Aktivierung dieser Zellen einen direkten und indirekten Einfluss auf synaptische Verbindungen ausübt.

Ein wichtiger Aspekt des verwendeten Ablationssystems ist, dass aufgrund der allgemeinen toxischen Wirkung von Ganciclovir keine Langzeitstudie durchgeführt werden kann, sodass der Beobachtungszeitraum auf vier Wochen begrenzt ist. Es bleibt abzuwarten, ob längere Behandlungen eine Änderung der momentanen Datenlage herbeiführen. Trotz dieser Einschränkung muss betont werden, dass die Arbeitsgruppe von Mathias Jucker mit ihrem eleganten wissenschaftlichen Ansatz gerade erst begonnen hat, den Einfluss von inflammatorischen Vorgängen auf die neurodegenerativen Vorgänge bei der Alzheimerkrankheit aufzuklären. Insofern hat die Arbeit von Grathwohl und Kollegen über Ihren eigenen wissenschaftlichen Stellenwert hinaus auch eine Art Signal- und Initialcharakter, da hier

die Bedeutung inflammatorischer Vorgänge für neurodegenerative Krankheiten unterstrichen wurde.

Da nicht nur Mikrogliazellen, sondern auch Astrozyten an der inflammatorischen Komponente der Alzheimerkrankheit beteiligt sind, könnte ein nächster Schritt sein, auch deren Ablation zu untersuchen. Insbesondere vor dem Hintergrund, dass einige Arbeitsgruppen auch für diese Zellpopulation gezeigt haben, dass sie A β aufnehmen können. Für die Mikroglia selbst ist die Rolle für synaptische Funktionen und die Interaktion mit fibrillären und oligomeren A β -Peptiden zu klären, eine Charakterisierung früher Ereignisse, welche der Mikroglia ihrer Fähigkeit berauben, A β -Ablagerung wirksam durch Phagozytose zu verhindern, könnte unser Verständnis zur Alzheimer-Pathogenese erweitern und therapeutische Optionen vor allem zur präventiven Behandlung der Krankheit eröffnen.

Literatur

- Bessis, A., Béchade, C., Bernard, D. und Roumier, A. (2007): Microglial control of neuronal death and synaptic properties. *Glia* 55: 233-238.
Chakrabarty, P., Jansen-West, K., Beccard, A.,

Ceballos-Diaz, C., Levites, Y., Verbeeck, C., Zubair, A. C., Dickson, D., Golde, T. E. und Das, P. (2010): Massive gliosis induced by interleukin-6 suppresses A β deposition in vivo: evidence against inflammation as a driving force for amyloid deposition. *FASEB J* 24: 548-559.

Heneka, M.T., Sastre, M., Dumitrescu-Ozimek, L., Hanke, A., Dewachter, I., Kuiperi, C., O'Banion, K., Klockgether, T., van Leuven, F. und Landreth, G.E. (2005): Acute treatment with the PPAR γ agonist pioglitazone and ibuprofen reduces glial inflammation and Abeta1-42 levels in APPV7171 transgenic mice. *Brain* 128: 1442-1453.

Wake, H., Moorhouse, A.J., Jinno, S., Kohsaka, S. und Nabekura, J. (2009): Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *J. Neurosci* 29: 3974-3980.

Wyss-Coray, T., Lin, C., Yan, F., Yu, G.Q., Rohde, M., McConlogue, L., Masliah, E. und Mucke, L. (2001): TGF- β 1 promotes microglial amyloid- β clearance and reduces plaque burden in transgenic mice. *Nat. Med* 7: 612-618.

Kurzbiografien

Stefan Grathwohl hat von 2001 bis 2006 physiologische Chemie mit Schwerpunkt Neurobiologie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen studiert. Er war von 2004 bis 2005 wissenschaftlicher Assistent bei Prof. Dr. Hafezparast an der University of Sussex (UK), wo er an der Charakterisierung eines Mausmodells für Amyotrophe Lateralsklerose arbeitete. Seit 2006 promoviert er am Hertie-Institut für klinische Hirnforschung in der Arbeitsgruppe Zellbiologie Neurologischer Erkrankungen von Prof. Dr. Jucker mit dem Titel: „Rolle des residenten und peripheren Immunsystems bei Mausmodellen der Alzheimererkrankung“.

Roland Kälin studierte von 1996 bis 2000 Biochemie am Biozentrum der Universität Basel. Bis 2005 promovierte er bei Prof. Brändli an der ETH Zürich über embryonale Gefäßentwicklung und erhielt dafür 2008 den Schweizer Pfizer-Forschungspreis im Bereich Herzkreislauf. Als Postdoc entwickelte er das embryonale Froschmodell zum Werkzeug für *in vivo* Medikamentenscreens weiter. Seit 2007 arbeitet er als wissenschaftlicher Assistent bei Prof. Heppner am Institut für Neuropathologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin über die Rolle der Mikroglia bei neurodegenerativen und neoplastischen Erkrankungen.

Frank Heppner studierte Medizin an den Universitäten Lübeck, Hamburg, Berlin und London. Promotion 1999 an der



Stefan Grathwohl, Roland Kälin, Frank Heppner, Mathias Jucker

Humboldt-Universität zu Berlin. Postdoc-Zeit und Weiterbildung zum Facharzt für Neuropathologie als Stipendiat der Human Frontier Science Program Organization und der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina am Institut für Neuropathologie in Zürich und in Bonn sowie am Institut für Klinische Pathologie Zürich (1999 - 2003), anschließend Oberarzt am Institut für Neuropathologie Zürich und Habilitation für Neuropathologie (2005). Seit 2007 W3-Professor und Direktor des Instituts für Neuropathologie der Charité - Universitätsmedizin Berlin. Forschungsschwerpunkt ist die Rolle des Immunsystems bei neurodegenerativen

Erkrankungen, insbesondere bei Morbus Alzheimer.

Mathias Jucker studierte Naturwissenschaften an der Eidgenössischen Technischen Hochschule (ETH) in Zürich und promovierte dort 1988. Hierauf arbeitete er am National Institute on Aging in Baltimore/Bethesda, USA, bevor er 1996 als Associate Professor (und START-Stipendiat) in die Schweiz an die Universität Basel zurückkehrte. 2003 wurde er auf seine derzeitige Professur in Tübingen berufen. Als einer der vier Direktoren des Hertie-Instituts für klinische Hirnforschung und

Leiter der Abteilung Zellbiologie Neurologischer Erkrankungen untersucht er zusammen mit seinem Team die zellulären und molekularen Mechanismen, die für die Hirnalterung und die Entstehung der Alzheimerkrankheit verantwortlich sind.

Korrespondenzadresse

Stefan Grathwohl

Universitätsklinikum Tübingen
Hertie-Institut für Klinische Hirnforschung
Otfried-Müller-Str. 27, 72076 Tübingen
Tel.: +49 7071 2986851
E-Mail: s.grathwohl@gmx.de

Open-Access-Publizieren – Merkblatt für Universitäten zur Antragstellung erschienen

Die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) hat ein neues Förderprogramm zum „Open-Access-Publizieren“ beschlossen, das sich an wissenschaftliche Hochschulen richtet. Im Rahmen des Programms können die Hochschulen Mittel einwerben, um für ihre Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler die Artikelbearbeitungsgebühren zu übernehmen, die für Publikationen in reinen Open-Access-Zeitschriften anfallen.

Detaillierte Informationen zum neuen Programm und zur Antragstellung sind einem Merkblatt zu entnehmen, das die DFG nun veröffentlicht hat.

Demnach werden in dem Antrag neben Ausführungen zum Publikationsaufkom-

men der Universität und zur bisherigen Finanzierung von Open-Access-Publikationen insbesondere Informationen zu den Verfahren erwartet, mit denen die Antragsteller die bei der DFG eingeworbenen Mittel innerhalb der Einrichtung weiterverteilen. Zudem sollen die Antragsteller darstellen, mit welchen weiteren Maßnahmen sie Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler beim Publizieren in Open-Access-Formaten unterstützen.

Anträge können nur von wissenschaftlichen Hochschulen gestellt werden. Sie müssen bis zum 1. April 2010 in der Geschäftsstelle der DFG (Dr. Johannes Fournier, Gruppe Wissenschaftliche

Bibliotheken und Informationssysteme), Kennedyallee 40, 53175 Bonn, eingegangen sein.

Das Merkblatt zum Förderprogramm „Open-Access-Publizieren“ findet sich unter: www.dfg.de/forschungsfoerderung/formulare/download/12_20.pdf

Kontakt in der DFG-Geschäftsstelle

Dr. Johannes Fournier,
Gruppe Wissenschaftliche Bibliotheken und Informationssysteme
Tel.: +49 228 885-2418
E-Mail: Johannes.Fournier@dfg.de



Dein Gehirn – denken, fühlen, handeln

Eindrücke aus einer Ausstellung im Weltkulturerbe „Völklinger Hütte“

Joachim W. Deitmer



Eine Ausstellung über das Gehirn des Menschen in der Erzhalle der „Völklinger Hütte“, seit zehn Jahren ein Europäisches Zentrum für Kunst und Industriekultur und Weltkulturerbe der UNESCO, findet derzeit viel Anklang. In einer großen, aufgearbeiteten Industriehalle sind über 60 Exponate, Tafeln, Interaktions- und Übungsstände aufgebaut und informativ illustriert. Die Ausstellung wurde vom Team des nationalen dänischen Science-Centers Experimentarium in Kopenhagen/Hellerup entwickelt. Seit seinem Beginn 2006 haben das „erfolgreichste, reisende ScienceCenter-Projekt“ über 2,2 Millionen Menschen besucht, seit Mai 2009 auch erstmals in Deutschland im Industriemuseum „Völklinger Hütte“, etwa zehn km saarabwärts von Saarbrücken.

Die Ausstellungshalle in dem Komplex zu finden stellt den Besucher vor eine erste Suchaufgabe und gibt ihm einen Eindruck von der gigantischen Industrieanlage, die bis 1986 Stahl produziert und dann stillgelegt wurde. Der Weg führt im Halbdunkel durch eine Reihe von Hallen und Gängen, Treppen und Stiegen, begleitet von Klängen aus der ehemaligen Arbeitswelt. Die Ausstellung auf etwa 1000 m² beginnt mit ersten Einführungen zur Evolution des

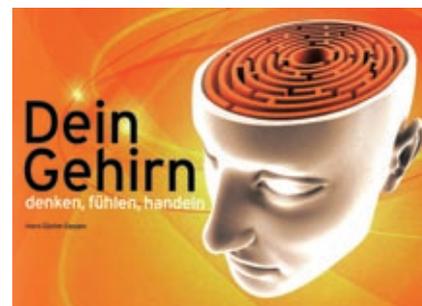
Menschen und allgemeinen Informationen über den Aufbau des Gehirns. Alle Texte, die sehr bedacht und relativ kurz gehalten sind, werden auf Deutsch, Französisch und Englisch gegeben. Man kann das menschliche Hirn als Ganzes, geschnitten und in unterschiedlichen Ansichten bestaunen, und für Gruppen werden auf Anmeldung sogar frische Schweinehirne demonstriert und in Scheibchen zerlegt. Es werden die Sinne und verschiedene Leistungen des Gehirns nicht nur erläutert und illustriert, sondern auch in interaktiven Übungen an Computern und Geräten nahe gebracht, inklusive einer Reihe von Fehlleistungen und Sinnestäuschungen. Die Steuerung von Bewegung durch das Gehirn wird durch Übungen an Balance- und Klettergeräten erfahrbar gemacht und dürfte besonders Kindern und Jugendlichen viel Spaß machen. Begleitet wird die Ausstellung durch Zitate von „prominenten Denkern“ über das Gehirn, wie z.B. das des Philosophen Plutarch (45-125): „Das Gehirn ist nicht nur ein Gefäß, das gefüllt werden muss, sondern ein Feuer, das gezündet werden will“, oder „Leere Gehirne dürsten nach Lärm“ von Hans Kaspar (1916-1990), oder das berühmte „Je pense donc je suis“. Auch die Erforschung des Gehirns und seine Geschichte sowie zahlreiche Aspekte, die auf Leistungen unseres Gehirns zurückzuführen sind, werden thematisch aufgearbeitet, einschließlich vieler praktischer Hinweise. So klären Schautafeln über den Schlaf (Warum schlafen wir?) oder Schmerz auf, über kognitive Leistungen, Bewusstsein und Krankheiten des Gehirns.

Das Begleitbuch zur Ausstellung „Dein Gehirn - denken, fühlen, handeln“ wurde von Hans Günter Gassen zusammengestellt und vom Direktor des Museums, Meinrad Maria Grewenig, als „Edition Völklinger Hütte“ herausgegeben. Es ist auf 160 Seiten reich und gut bebildert und umfasst viele Facetten unseres Gehirns in überschaubarer Dichte, auf den ersten Blick eine ebenfalls sehr gelungene Abhandlung (€ 19,90).

Eine Ausstellung über unser Gehirn, dachte ich zuvor, das ist doch ein fast

aussichtloses Unterfangen und muss vor Lücken und Ungenauigkeiten nur so strotzen. Ich wurde eines Besseren belehrt durch eine didaktisch wie wissenschaftlich gelungene Erlebniswelt. Die Ausstellung beeindruckt vor allem durch ihre Vielseitigkeit und informative Behandlung sehr unterschiedlicher Bereiche rund um unser Gehirn, aber auch durch ihre Kompaktheit: Sie ist in der großen Halle vollständig zu überblicken. Als ich zum ersten Mal auf die Uhr schaute, waren zwei Stunden vergangen. Mein Fazit: eine sehr gelungene Ausstellung und für Kinder wie Erwachsene unbedingt zu empfehlen.

Es sollte nicht unerwähnt bleiben, dass das Industriemuseum „Völklinger Hütte“, eines der größten ihrer Art in Europa, selbst sehr beeindruckend ist und für sich allein ein Besuch lohnt. Es finden zudem stets mehrere Ausstellungen parallel statt, zurzeit drei, die neben der Wissenschaft der modernen Kunst (Oskar Alt) und der Geschichte („60 Jahre Staatsgeschenke“)



gewidmet sind. Die Ausstellung „Mein Gehirn – denken, fühlen, handeln“ ist täglich geöffnet und wurde wegen ihres großen Erfolgs bis zum 25. Juli 2010 verlängert.

www.voelklinger-huette.org/de/dein-gehirn-denken-fuehlen-handeln/

Kontakt

Prof. Dr. Joachim W. Deitmer
 Universität Kaiserslautern
 Abteilung für Allgemeine Zoologie
 Erwin-Schrödinger-Straße 13
 67663 Kaiserslautern
 Tel.: +49 631 205 2877
 Fax: +49 631 205 3515
 E-Mail: deitmer@biologie.uni-kl.de

Ursula M. Händel-Tierschutzpreis – 50.000 Euro für den Tierschutz in der Forschung

Die DFG schreibt zum vierten Mal den Ursula M. Händel-Tierschutzpreis aus. Ziel des Preises ist die Auszeichnung von Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftlern, die sich besonders um die Förderung des Tierschutzes in Wissenschaft und Forschung verdient machen. Der Preis wird für wissenschaftliche Forschungsprojekte vergeben, die dazu beitragen, die Belastung für die in einem Tierversuch eingesetzten Tiere zu vermindern, deren Zahl zu reduzieren oder sie zu ersetzen (3-R-Konzept: Reduction, Refinement, Replacement). Für den Preis können sowohl abgeschlossene

Projekte als auch vielversprechende laufende Arbeiten berücksichtigt werden.

Der Preis ist mit bis zu 50.000 Euro dotiert und soll für Vorhaben verwendet werden, die dem Tierschutz in der Forschung zugutekommen. Kriterien für die Preisvergabe sind die Qualität und Originalität der bisherigen oder der geplanten Forschungsarbeiten und deren Bedeutung für den Tierschutz in der Forschung.

Die Bewerbungsunterlagen sollen einen wissenschaftlichen Bericht über die Forschungsergebnisse und deren Bedeutung für den Tierschutz (maximal zehn Seiten),

einen tabellarischen Lebenslauf, eine Publikationsliste der letzten fünf Jahre sowie relevante Veröffentlichungen enthalten. Bei laufenden Forschungsprojekten sollen der wissenschaftliche Hintergrund, die Forschungsziele, das Arbeitsprogramm und die Bedeutung für den Tierschutz (maximal zehn Seiten) dargelegt werden. Darüber hinaus sollte auch ein Hinweis auf die geplante Verwendung der Mittel gegeben werden.

Bewerbungsschluss ist der 19. April 2010.

Kontakt in der DFG-Geschäftsstelle

Dr. Sonja Ihle

Kennedyallee 40

53175 Bonn

Tel.: +49 228 885 2658

E-Mail: Sonja.Ihle@dfg.de

Vom Geist zum Molekül, and back again - Gedächtnis. Die Natur des Erinnerens

Besprochen von Randolph Menzel; Freie Universität Berlin, Institut für Biologie – Neurobiologie, Königin-Luise-Str. 28/30, 14195 Berlin

Larry Squire und Eric Kandel haben ihr großartiges Buch über das „Gedächtnis, die Natur des Erinnerens“ für eine 2. Auflage überarbeitet. Damit wurde dieses so inhaltsreiche Buch auf den neuesten Stand der schnell fortschreitenden Forschung gebracht. Das bewährte Konzept haben die Autoren beibehalten.

Der Einstieg in die Denkweise der Autoren erfolgt mit einer prägnanten Darstellung der Geschichte der Gedächtnisforschung. Zwei Wurzeln der modernen Neurowissenschaften führen die Autoren zusammen, die Biologie des Nervensystems und die Zuordnung kognitiver Leistungen zu Gehirnanalen. Aus dieser Synthese ergibt sich geradezu zwingend eine „Molekularbiologie der Kognition“, allerdings, so muss man einschränkend sagen, in ihren ersten Ansätzen und mehr als eine hoffnungsfrohes Konzept denn als eine bewährte Disziplin. Der Hoffnungsträger hierbei ist die Beschränkung auf das „Gedächtnis“ als der integrierenden Komponente und das Verständnis, dass sich kognitive Leistungen wie Aufmerksamkeit, Erwarten, Planen, Entscheiden und Bewusstwerden als

Eigenschaften des Gedächtnisses verstehen lassen. Dabei folgen die Autoren einem sich immer wieder bewährenden Ansatz, den Ewald Hering im vorigen Jahrhundert so formulierte: „Das Gedächtnis bündelt die zahllosen Phänomene unserer Existenz zu einem einzigen Ganzen.... Gäbe es nicht die bindende und einigende Kraft des Gedächtnisses, unser Bewusstsein würde in ebenso viele Einzelteile zerfallen, wie wir Sekunden gelebt haben“ (auf S.1 zitiert).

Die Darstellung der Inhalte folgt einem klugen didaktischen Konzept, bei dem Entdeckungen (etwa bei der Untersuchung von Patienten oder beim Einsatz neuer Methoden) zum Ausgangspunkt gewählt, die Phänomene dann mit den eigenen Erfahrungen des Lesers verbunden, und schließlich neue Einsichten an Hand von konkreten experimentellen Daten belegt und systematisiert werden. In der Tradition der amerikanischen Lehrbücher werden die Heroen der jeweiligen Entdeckungen vorgestellt (häufig mit Abbildungen) und ihre Leistungen in einen größeren Zusammenhang gebracht. Auf diesem Weg gelangt man in den ersten

Kapiteln rasch zu den basalen kognitiven Phänomenen des Gedächtnisses und seiner neuronalen Grundlagen, wobei *Aplysia* und *Drosophila* die Paradebeispiele abgeben. Die beiden folgenden Kapitel über das deklarative Gedächtnis wurden von Larry Squire gründlich überarbeitet. Zehn Abbildungen wurden neu aufgenommen bzw. alte auf der Grundlage neuer Erkenntnisse ergänzt. Von der systemischen Betrachtung des deklarativen Gedächtnisses gehen die Autoren dann zur Darstellung der Funktionsweise und der synaptischen Plastizität des Hippokampus über. Die neuen Erkenntnisse schlagen sich hier überwiegend im Text nieder, wobei beeindruckt mit welcher Zielsicherheit die wirklich wichtigen neuen Befunde in diesem schier unüberschaubaren Datenmaterial ausgewählt wurden.

Entsprechend des großen Umfangs neuer Einsichten wurden die zentralen Kapitel über die Gedächtniskonsolidierung gründlich überarbeitet und teilweise mit neuen Abbildungen versehen. Diese beziehen sich vor allem auf die bahnbrechenden Arbeiten an kultivierten Neuronen von *Aplysia* und das Phänomen des synaptischen Tagging. Die systemischen Aspekte der Konsolidierung kommen etwas zu kurz, und die Rolle des Schlafs für die Gedächtniskonsolidierung wird an anderer Stelle (Hippokampus, deklaratives Gedächtnis) erwähnt.

Priming, Wahrnehmungslernen, emotionales Lernen und Gedächtnis für Gewohnheiten und Fertigkeiten werden in zwei Kapiteln behandelt, bei denen wiederum von Alltagserfahrungen und der Darstellung



von pathologischen Fällen ausgehend die neuronalen Mechanismen erläutert werden. Auch hier wurden eine ganze Reihe neuer Abbildungen aufgenommen, mit denen neue experimentelle Daten vorgestellt werden, wobei auffällt, dass die Rolle der prämotorischen Regionen des Vorderhirns und des Cerebellums sehr stiefmütterlich wegkommen. Auch die neuen Befunde über instrumentelles Lernen bei Modellorganismen (*Drosophila*, Mollusken) findet man hier leider nicht. Im Schlusskapitel, in dem die Altersdemenz dargestellt wird, fällt auf, wie zurückhaltend sich die Autoren über die Perspektiven einer Behandlung der Alzheimererkrankung äußern.

Zur Übertragung des englischen Textes in den deutschen ist anzumerken, dass glücklicherweise bei kritischen Übersetzungen die englischen Begriffe in Klammern mit angegeben werden, z.B. kundtun (declare), Spuren-Reflex-Lidschlusskonditionierung (trace-eyeblick-conditioning), keine Übereinstimmung (nonmatch), langsamwelliger Schlaf (slow wave sleep). Allerdings ist schwer nachzuvollziehen, warum path integration in Pfadintegration und nicht wie üblich in Wegintegration und monkey in Tieraffe übersetzt wird.

Für ein Buch von weniger als 250 Seiten bietet diese Darstellung eine Fülle von klug ausgewähltem Material und neuen Einsichten. Man kann natürlich nicht erwarten, dass das riesige Forschungsgebiet am Gedächtnis in allen Aspekten dargestellt wird. Dazu gibt es andere Bücher (z.B. J.H. Byrne, (Ed.) (2008): *Learning and Memory: A comprehensive reference*. Amsterdam: Elsevier, vier Bände). Durch Beschränkung gewinnen die Autoren eine neue Sicht auf eines der spannendsten Forschungsgebiete der Neurowissenschaften, und sie gewinnen – so ist zu hoffen – eine breite Leserschaft. Dieses Buch kann uneingeschränkt allen Interessierten empfohlen werden, wobei ich zu den Interessierten nicht nur die Neurowissenschaftler aller colour sondern auch Studenten, Schüler und Lehrer an Gymnasien zähle. Auch wenn man so manches Detail neuronaler Mechanismen oder kognitiver Testprozeduren bereits kennt, wird man einen großen Gewinn aus der Darstellung der synthetischen Sicht und der Einbindung in den wissenschaftshistorischen Kontext ziehen.

Larry R. Squire und Eric R. Kandel
Gedächtnis, die Natur des Erinnerns.
2. Auflage 3009, 240 S. 146 Abb. in Farbe, geb., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2009, ISBN 978-3-8274-2110-3, EUR 29,95

Ausblick

Folgende Beiträge werden für die nächsten Ausgaben von *Neuroforum* vorbereitet:

Die kognitive Neurowissenschaft von willentlicher Aktion und Nicht-Aktion
Marcel Brass und Simone Kuehn

Intrazelluläre Ionenhomöostase und deren Beeinträchtigung bei hepatischer Enzephalopathie
T. Kelly und C. R. Rose

Schmerzverarbeitung in multisensorischer Umgebung
Marion Höfle, Michael Hauck, Andreas K. Engel, Daniel Senkowski

Impressum

Herausgeber:

Neurowissenschaftliche Gesellschaft e.V.
Bankverbindung: Berliner Bank AG,
BLZ 100 200 00, Kto.-Nr. 810 505 1800
<http://nwg.glia.mdc-berlin.de>

Redaktion:

Helmut Kettenmann (v.i.S.d.P.)
Meino Alexandra Gibson

Redaktionsanschrift:

Max-Delbrück-Centrum für
Molekulare Medizin (MDC)
Robert-Rössle-Str. 10, 13092 Berlin
Tel./Fax: 030 9406 3133/-3819
E-Mail: gibson@mdc-berlin.de

Redaktionsgremium:

Ad Aertsen, Freiburg
Mathias Bähr, Göttingen
Niels Birbaumer, Tübingen
Ulrich Dirnagl, Berlin
Andreas Draguhn, Heidelberg
Ulf Eysel, Bochum
Michael Frotscher, Freiburg
Eckart Gundelfinger, Magdeburg
Hanns Hatt, Bochum
Hans-Peter Hartung, Düsseldorf
Klaus-Peter Hoffmann, Bochum
Uwe Homberg, Marburg
Sigismund Huck, Wien
Sigrun Korsching, Köln
Georg W. Kreutzberg, Heidelberg
Wolfgang H. Oertel, Marburg
Hans-Joachim Pflüger, Berlin
Rainer Schwarting, Marburg
Petra Störig, Düsseldorf
Herbert Zimmermann, Frankfurt/M.

Verlag: Spektrum Akademischer Verlag
(Spektrum Akademischer Verlag ist ein
Imprint der Springer-Verlag GmbH)
Tiergartenstr. 17
69121 Heidelberg
Tel.: 06221/9126-300
Fax: 06221/9126-370
<http://www.spektrum-verlag.de>

Geschäftsführer:

Derk Haank, Martin Mos, Peter Hendriks

Anzeigen:

top-ad Bernd Beutel
Hammelbächerstr. 30, 69469 Weinheim
Tel./Fax: 06201/29092-0 /-20
E-Mail: info@top-ad-online.de

Satz und Layout:

BIOCOM Projektmanagement GmbH
Brunnenstr. 128, 13355 Berlin
Tel./Fax: 030/264 921-30 /-11

Druck und Auslieferung:

Stürtz GmbH, Würzburg

Abo-Service:

Springer Customer Service Center GmbH
Tiergartenstr. 17, 69121 Heidelberg
Tel.: 06221/487-8043
E-Mail: subscriptions@springer.com

Titelgestaltung:

Eta Friedrich, Berlin

Erscheinungsweise viermal im Jahr.

Neuroforum ist das Publikationsorgan der
Neurowissenschaftlichen Gesellschaft.

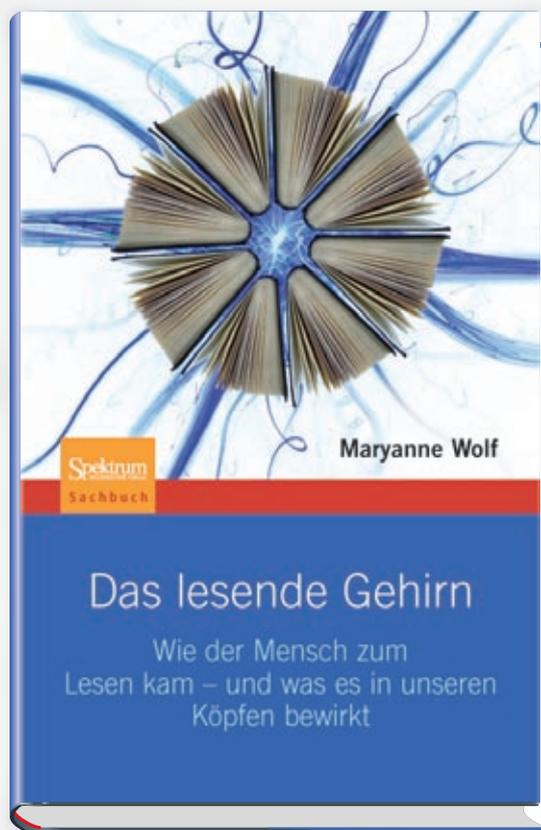
Bezugspreise: Jahresabonnement (4 Hefte)
Einzelperson Inland EUR 65,00, Ausland
EUR 68,00; Firmen, Bibliotheken Inland EUR
211,50, Ausland EUR 214,50; Studenten (bei
Vorlage der Immatrikulationsbescheinigung o.
ä.) Inland EUR 35,00, Ausland EUR 38,00. Ein-
zelheft Inland EUR 26,75. Alle Preise inkl. Ver-
sandkosten (Abonnement: Inland EUR 20,00,
Ausland EUR 23,00; Einzelheft: Inland EUR
2,86) und MwSt. Eine Abonnement-Bestellung
kann innerhalb von zwei Wochen schriftlich
beim Abo-Service in Heidelberg widerrufen
werden. Das Abonnement gilt zunächst für
ein Jahr und verlängert sich jeweils um ein
weiteres Jahr, falls es nicht spätestens sechs
Wochen vor Ablauf gekündigt wird. Bei Nicht-
lieferung aus Gründen, die nicht vom Verlag
zu vertreten sind, besteht kein Anspruch auf
Nachlieferung o. Erstattung vorausbezahlter
Bezugsgelder. Gerichtsstand, Erfüllungs- u.
Zahlungsort ist Heidelberg.

LESEN!

Wie der Mensch zum Lesen kam –
und was es in unseren Köpfen bewirkt

»Ein Plädoyer für die sprachlichen Fantasieräume der Literatur im Gegensatz zur reinen Informationsverarbeitung – und selbst ein Lektürevergnügen.«

Gregor Dotzauer,
Alfred-Kerr-Preisträger
in *Börsenblatt* 3/2010



»Das Geheimnis im Herz des Lesens«, schreibt Marianne Wolf, die Verfasserin des maßstabsetzenden Standardwerks zur Biologie des Lesens, »ist die Zeit, mit der es dem Gehirn die Freiheit gibt, Gedanken zu haben, die tiefer sind als die Gedanken, die ihm bisher gekommen sind.«

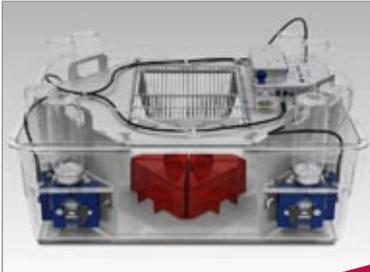
Frank Schirrmacher,
Herausgeber der FAZ, in
seinem Buch *Payback*

Marianne Wolf
Das lesende Gehirn
1. Aufl. 2010, 342 S., 49 Abb., geb. m. SU
€ (D) 26,95 / € (A) 27,71 / CHF 42,-
ISBN 978-3-8274-2122-7

► Erhältlich in jeder Buchhandlung oder direkt unter www.spektrum-verlag.de

Spektrum
AKADEMISCHER VERLAG

In-Vivo-Phenotyping

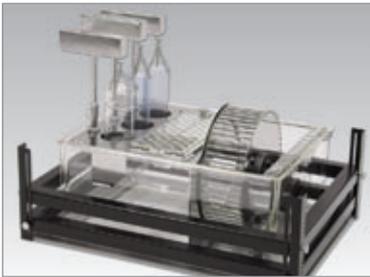


IntelliCage by NewBehavior

NEW!

IntelliCage by NewBehavior

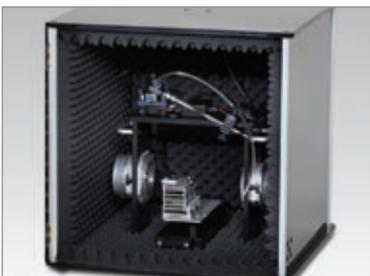
- Fully automated screening for behavioral and cognitive malfunctions of mice living in social groups in a home cage equipped with 4 programmable operant corners
- Programmable; operant, spatial or discrimination tests
- Transponder Technology
- High level of standardization
- Uninterrupted short- or long-term monitoring
- Mechanistic analysis of detected effects



PhenoMaster: Single Home Cage

Physiology & Metabolism

- Drinking & Feeding monitoring
- Calorimetry
- Activity
- Physiological Parameters



Startle Response System

Behavior

- Learning & Memory (associative and operant)
- Anxiety, Depression, Stress Response
- Exploration and Motor Coordination



Multi Conditioning System