Der Geruchsinn der Insekten – Primärprozesse der Duftstofferkennung und Kodierung

Silke Sachse und Jürgen Krieger

Zusammenfassung

Duftstoffe geben Insekten überlebenswichtige Informationen über ihre Umwelt und steuern ihr Verhalten in vielfältiger Weise. Ein bemerkenswert empfindlicher und spezialisierter Geruchssinn ermöglicht es den Tieren dabei, auch noch geringste Mengen relevanter Duftstoffe zu registrieren und dadurch z. B. Nahrung, Artgenossen oder Feinde wahrzunehmen. In den letzten Jahren wurden erhebliche Fortschritte im Hinblick auf das Verständnis der molekularen Elemente und zellulären Vorgänge bei der Erkennung von Duftstoffen auf der Antenne, sowie den Prinzipien der Prozessierung von Duftsignalen im Gehirn erzielt. Die derzeitigen Befunde zeigen, dass "Riechhaare" auf den Antennen chemosensorische Funktionseinheiten mit einer speziellen molekularen Ausstattung sind. Sie enthalten verschiedene Bindeproteine, die Duftstoffe zu spezifischen Rezeptoren in der dendritischen Membran der Riechsinneszellen transferieren. Die Bindung von Duftstoff an das Rezeptorprotein initiiert ionotrope und / oder metabotrope Mechanismen, welche die Information über den chemischen Reiz in Potenzialänderungen übertragen, die im Axon des sensorischen Neurons Veränderungen der spontanen Aktionspotenzialfrequenz verursachen. Die duftabhängigen Aktionspotenziale gelangen als Eingangssignale entlang der Axone von der Antenne in den Antennallobus des Gehirns. Im Antennallobus, der ersten Umschaltstelle für Duftinformation, erfahren die Eingangssignale durch ein komplexes Netzwerk von lokalen Interneuronen eine umfangreiche Prozessierung, bevor die prozessierten Signale über Projektionsneurone an höhere Hirnzentren weitergegeben werden und dort zu einer Geruchswahrnehmung führen.

Abstract

Odorants provide insects with crucial information about their environment and trigger various insect behaviors. A remarkably sensitive and selective sense of smell allows the animals to detect lowest amounts of relevant odorants and thereby to recognize e.g. food, conspecifics and predators. In recent years, significant progress has been made towards understanding the molecular elements and cellular mechanisms of odorant detection in the antenna and the principles underlying the primary processing of olfactory signals in the brain. The findings show that olfactory hairs on the antenna are specifically equipped chemosensory detector units. They contain several binding proteins, which transfer odorants to specific receptors residing in the dendritic membrane of olfactory sensory neurons. Binding of odorant to the receptor initiates ionotropic and /or metabotropic signal cascades, translating the chemical signal into potential changes, which alter the spontaneous action potential frequency in the axon of the sensory neuron. The odor-dependent action potentials propagate from the antennae along the axon to the brain leading to an input signal within the antennal lobe. In the antennal lobe, the first relay station for olfactory information, the input signals are extensively processed by a complex network of local interneurons, before the processed signals are relayed by projection neurons to higher brain centers, where olfactory perception takes place.

Keywords: odorant receptors; binding proteins; signal transduction; antennal lobe; olfactory coding

Einleitung

Wer erinnert sich nicht an einen lauen Sommerabend im Freien, an dem Stechmücken die eigene Haut "unwiderstehlich" fanden. Und wer kennt nicht die scheinbar magische Anziehungskraft, die überreifes Obst in der Küche auf Fruchtfliegen ausübt. Ursache derart "tierischer" Belästigungen sind Duftstoffe, die von unserem Körper oder von Früchten ausgehen, und den Mücken einen potenziellen Blutwirt anzeigen bzw. den Fliegen Aussicht auf Nahrung oder einen geeigneten Eiablageplatz versprechen. Die attraktiven chemischen Signale werden aus der Ferne vom hochempfindlichen Geruchssinn der Tiere wahrgenommen und steuern im Gehirn charakteristische Suchverhaltensprogramme, die sie schließlich zum Ort der Duftquelle führen.

Wie an diesen alltäglichen Beispielen nachvollziehbar wird, spielt der Geruchssinn für die meisten Insekten eine zentrale Rolle für die Registrierung von kleinen, flüchtigen Verbindungen in der Umwelt. Dabei ist die Fähigkeit zur sensitiven und spezifischen Erkennung von Duftstoffen für Insekten häufig überlebenswichtig, da die chemischen Signale zum Teil essenzielle Informationen über Nahrungsquellen, Feinde oder Artgenossen liefern. Für die Partnerfindung und damit für das Überleben der Art ist die Registrierung von innerartlichen chemischen Signalen (Pheromonen) von außerordentlicher Bedeutung. Die Existenz von art-spezifischen Substanzen, die von weiblichen Tieren abgeben werden, um männliche Artgenossen anzulocken, wurde bereits 1879 vom Schweizer Naturforscher Auguste Fabre in Experimenten mit Nachtpfauenaugen erkannt (Fabre 1879). Es dauerte aber noch bis Ende der 1950er Jahre, bis es Alfred Butenandt und seinen Mitarbeitern gelang, aus etwa 500 000 Abdominaldrüsen weiblicher chinesischer Seidenspinner (Bombyx mori) 1 mg Bombykol, das erste identifizierte Sexualpheromon, zu isolieren (Butenandt et al. 1959). Etwa zeitgleich begann die detaillierte Erforschung der molekularen und zellulären Grundlagen der Erkennung und Verarbeitung von Duftstoffreizen bei Insekten. Bis heute sind dafür Seidenspinner und andere Falter aufgrund ihres hochempfindlichen und art-spezifischen Pheromonsystems, dem charakteristischen Pheromon-induzierten Verhalten, sowie der teilweise enormen Größe ihrer Antennen bevorzugte Untersuchungsobjekte. Die Honigbiene (Apis

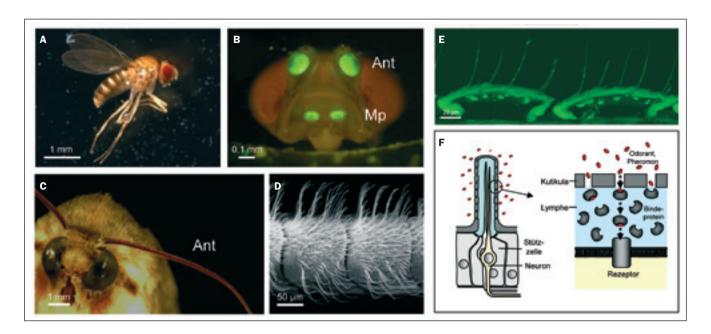


Abb. 1: Organisation des peripheren olfaktorischen Systems von Insekten.

A) Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* B) Kopf der Fruchtfliege mit olfaktorischen Anhängen: Antennen (Ant) und Maxillarpalpen (Mp). Die Riechorgane leuchten durch Expression eines grün fluoreszierenden Proteins (GFP) in den Riechsinneszellen. C) Kopf der Baumwolleule *Heliothis virescens* mit segmentierter Antenne. D) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von zwei Segmenten einer männlichen *H. virescens* Antenne. Die Oberfläche ist mit langen und kürzeren Sensillenhaaren bedeckt. Pheromon-reaktive Neurone finden sich vorwiegend in den langen trichoiden Sensillen. Mit Genehmigung von Springer Science+Business Media: J. Inv. Neurosci. 6, 2006, S.13-21, Gohl und Krieger, Fig. 1. E) Immunhistochemische Visualisierung der Expression des Rezeptors (HR13) für die Hauptkomponente des weiblichen Sexpheromongemisches von *H. virescens* in sensorischen Neuronen der langen Sensilla trichodea. Fluoreszens-Markierung an einem Gefrierschnitt der männlichen Antenne. F) Schematischer Aufbau eines trichoiden Sensillenhaares. Riechsinneszellen sind von Stützellen umgeben. Die Dendriten der olfaktorischen Neurone ragen in die wässrige Sensillenlymphe. Duftstoffmoleküle (Odorant, Pheromon) aus der Luft werden von Bindeproteinen in der Lymphe gelöst und zu Rezeptoren in der Dendritenmembran transportiert. Die *Drosophila*-Bilder (A und B) wurden von Veit Grabe (MPI, Jena) erstellt.

mellifera) hat sich dagegen aufgrund ihrer ausgeprägten Fähigkeit zur Klassifizierung und dem Erlernen von Düften als Modellorganismus für Untersuchungen der Duftsignalverarbeitung im Gehirn etabliert. Als außerordentlich wichtiger Modellorganismus der Insekten-Riechforschung hat sich in den letzten Jahren die Fruchtfliege Drosophila melanogaster erwiesen, die aufgrund der Einfachheit ihres olfaktorischen Systems und insbesondere ihrer genetischen Manipulierbarkeit einzigartige experimentelle Ansätze erlaubt. Daneben stehen heute allerdings auch vermehrt solche Insektenarten im Fokus der Olfaktions-Forschung, die als Lebensmittel- und Pflanzenschädlinge auftreten oder als Krankheitsüberträger unsere Gesundheit bedrohen. Vor dem Hintergrund der herausragenden Bedeutung von Duftstoffen für die Nahrungssuche und Wirtsfindung wird ihr chemischer Sinn als vielversprechender Angriffspunkt für die Entwicklung alternativer Strategien zur Abwehr und Bekämpfung der Schadinsekten untersucht.

In den letzten 20 Jahren wurden durch die Kombination biochemischer, molekularbiologischer und zellphysiologischer Ansätze bahnbrechende Fortschritte im Hinblick auf ein besseres Verständnis des Geruchssinns der Insekten erzielt. Dieser Artikel gibt eine kurze Übersicht über den aktuellen Kenntnisstand der peripheren und ersten zentralnervösen Prozesse der Duftwahrnehmung. Im Speziellen besprechen wir molekulare Elemente und Mechanismen, die der Erkennung von Duftstoffen in der Antenne zugrunde liegen, und gehen auf derzeit diskutierte Modelle zur Umwandlung des chemischen Signals in eine elektrische Antwort der Riechsinneszellen ein. Des Weiteren stehen die Prozessierungsvorgänge im Antennallobus, dem Pendant zum Bulbus olfactorius bei Wirbeltieren, im Vordergrund. Dabei werden wir besonders auf die Funktion und Verschaltung der beteiligten Neuronentypen eingehen und die Bedeutung des neuronalen Netzwerkes für die Kodierung von olfaktorischen Signalen erläutern.

Aufbau des peripheren olfaktorischen Systems der Insekten

Im Vergleich zu Säugern besitzen Insekten ein weniger komplexes olfaktorisches System, das u. a. aus wesentlich weniger Zellen in der Peripherie besteht. Mehrere Millionen Riechsinneszellen in der Säugernase stehen dabei nur Tausende bis Zehntausende olfaktorische Rezeptorzellen in den Antennen und den Maxillarpalpen der Insekten gegenüber. Trotz dieser geringeren Sinneszellzahl steht das Riechsystem der Insekten allerdings dem olfaktorischen System der Säuger hinsichtlich seiner Empfindlichkeit für bestimmte Duftstoffe in keiner Weise nach und übertrifft dieses oftmals sogar.

Bezüglich der peripheren Architektur ist das Riechsystems von Insekten und Säugern erstaunlich ähnlich. Bei Säugern ragen die sensorischen Cilien der Riechsinneszelle in den wässrigen nasalen Mukus, der das Riechepithel in der Nasenhöhle bedeckt; das Axon des olfaktorischen Neurons zieht hingegen direkt zum Riechkolben des Gehirns, dem olfaktorischen Bulbus.

Vergleichbar liegen bei Insekten die sensorischen Dendriten der Riechsinneszellen in mit wässriger Lymphe gefüllten kutikulären Strukturen, den sogenannten Sensillenhaaren (Abbildung 1); und auch die Axone der Riechneurone projizieren ohne "Umschaltstationen" direkt zum Gehirn, in diesem Fall zum sogenannten Antennallobus (Abbildung 4). Aufgrund ihrer Form und Oberflächenstruktur lassen sich verschiedene olfaktorische Haartypen unterscheiden: Häufig sind schlanke Sensilla trichodea, kegelförmige S. basiconica und grubenartige S. coeloconica zu finden. Gemeinsam sind allen olfaktorischen Haartypen Poren in der Kutikula, durch die Duftstoffmoleküle ins Innere des Sensillums und damit zur Membran der Sinneszelle vordringen können. Neurone, die auf "allgemeine" Duftstoffe antworten, kommen in allen Haartypen vor. Dagegen wurden Pheromon-sensitive Sinneszellen bislang nur in S. trichodea gefunden. Als Spezialisierung auf eine hochsensitive Pheromon-Detektion sind die Dendriten und damit auch die entsprechenden Pheromonhaare oftmals sehr lang

(Abbildung 1), was die rezeptive Gesamtoberfläche der Antenne stark vergrößert. Darüber hinaus sind Sinneshaare, die der Erkennung spezieller Duftstoffe (Pheromone, Wirtsduftstoffe) dienen, meist besonders zahlreich und enthalten in der Regel ein bis drei sensorische Neurone. In Sinneshaaren für "allgemeine" Duftstoffe kann die Zahl der reaktiven Neurone dagegen auch bis zu 30 Zellen und mehr betragen. Unabhängig von ihrer Anzahl werden die Zellkörper der Riechsinneszellen von drei Stützzellen umgeben: Dabei umhüllt die innerste, thekogene Zelle die Neurone wie eine Art Gliazelle. Daran schließen sich eine tormogene und trichogene Stützzelle an. Letztere sind wesentlich an der Aufrechterhaltung der Zusammensetzung der Sensillenlymphe beteiligt.

Odorant- und Pheromon-Bindeproteine

Bei Insekten beginnt der Riechprozess mit dem Eintritt von Signalmolekülen durch die Poren der Kutikula in das Sensillenhaar. Da Duftstoffe (Odorantien)

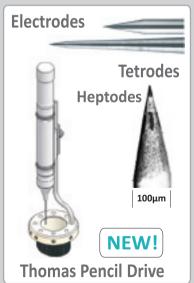
und insbesondere die Pheromone meist sehr hydrophobe Moleküle sind, ist ihre Löslichkeit in der wässrigen Sensillenlymphe allerdings extrem niedrig und der Transfer durch die hydrophile Flüssigkeit zu spezifischen Rezeptorproteinen in der Membran der Riechsinneszelle nicht ohne Weiteres möglich. Die Natur hat dieses Problem aber offenbar durch die Erfindung der Odorant-Bindeproteine (OBPs) bzw. spezieller Pheromon-Bindeproteine (PBPs) gelöst. Diese kleinen, globulären Proteine (12-16 kDa) werden von den thormogenen und trichogenen Stützellen synthetisiert und in die Sensillenlymphe sekretiert, wo sie in außerordentlich hohen Konzentrationen (10-20 mM) vorkommen. Strukturell sind Bindeproteine durch sechs hochkonservierte Cysteine in der Aminosäuresequenz gekennzeichnet. Diese bilden drei Disulphidbrücken aus und stabilisieren damit eine überwiegend α-helikale Proteinstruktur (Sandler et al. 2000). Bindungsstudien sowie NMR- und kristallografische Strukturanalysen sprechen dafür, dass OBPs und PBPs lipophile

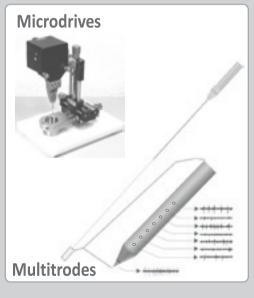


Thomas RECORDING GmbH

High Tech Made in GERMANY - info@ThomasRECORDING.com

Visit us at the Society for Neuroscience Meeting in Washington DC, Nov. 12-16, 2011







For 20 Years complete Neuro-Laboratory Equipment available from:

www.ThomasRECORDING.com



Neuro *forum* 3/11 91

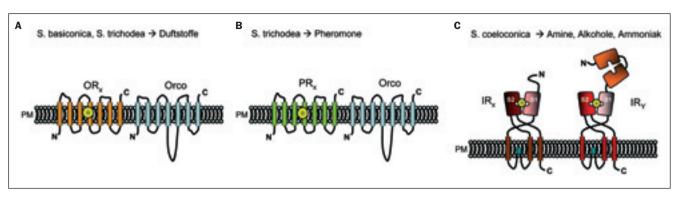


Abb. 2: Aufbau, Vorkommen und Liganden verschiedener olfaktorischer Rezeptortypen bei Insekten.

A) Riechsinneszellen der Sensilla basiconica und Sensilla trichodea, die auf generelle Duftstoffe reagieren, exprimieren jeweils einen distinkten Odorant-Rezeptor (ORx) und den generellen olfaktorischen Co-Rezeptor (Orco). Neuste Studien belegen, dass der ORx und Orco Heteromere ausbilden, wobei die ORx Untereinheit den Liganden bindet und Orco als Ionenkanal fungiert. B) Pheromon-sensitive Riechsinneszellen wurden bislang nur in den Sensilla trichodea gefunden. Sie verfügen über einen spezifischen Pheromon-Rezeptortyp (PRx) und exprimieren ebenfalls das Orco-Protein. ORs, PRs und Orcos weisen jeweils sieben membrandurchspannende Domänen auf. Das N-terminale Ende der Polypeptidkette liegt intrazelluär, der C-Terminus extrazellulär. C) Zwei Typen von ionotropen olfaktorischen Rezeptoren (IRx und IRy) werden in Riechsinneszellen der coeloconischen Sensillen exprimiert und bilden wahrscheinlich Heteromere. Ihre Grundstruktur ähnelt der von ionotropen Glutamat-Rezeptoren. Die meisten IRs (wie IRx) haben aber einen kürzeren N-Terminus. Charakteristisch für alle IRs sind drei Transmembrandomänen und eine Poren-Region, sowie eine Venusfliegenfallen-artige extrazelluläre S1 und S2 Ligandenbindungsdomäne. In A-C ist die mögliche Ligandenbindungstelle der Rezeptoren durch einen gelben Kreis angedeutet. PM=Plasmamembran.

Duftstoffmoleküle durch Einlagerung in eine hydrophobe Bindungstasche praktisch wasserlöslich machen und so transportieren können. Auf diese Weise schützen sie die Duftstoffmoleküle vermutlich auch vor einer Spaltung oder Modifikation durch in der Sensillenlymphe enthaltene Abbau- und Transformationsenzyme.

Biochemische Analysen der Sensillenlymphe sowie Untersuchungen des Genoms und der in der Antenne exprimierten Gene haben in allen bislang untersuchten Spezies eine Vielzahl von OBP-Typen und meist mehrere PBP-Typen nachgewiesen (Vogt 2003; Zhou 2010). Zudem wurden in der Lymphe eines einzelnen Sensillenhaars mehrere Typen von Bindeproteinen gleichzeitig gefunden. Dies legt die Vermutung nahe, dass verschiedene Bindeproteine unterschiedliche Duftstoffe transportieren und somit auch zur Spezifität des olfaktorischen Systems beitragen. Tatsächlich haben Bindungsstudien für verschiedene OBP-Typen unterschiedliche, teils überlappende Ligandenspektren ermittelt (Qiao et al. 2010). Studien am Pheromonsystem von Nachtfaltern und Drosophila haben zudem gezeigt, dass PBPs stärker als OBPs auf spezielle Liganden "getuned" sind und in spezifischer Weise nur mit bestimmten Pheromonkomponenten interagieren. Mithilfe Rezeptor-exprimierender Zelllinien und aufgereinigten Bindeproteinen konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass ein bestimmtes PBP und ein distinkter Pheromon-Rezeptor in der Erkennung einer art-spezifischen Pheromonkomponente zusammenspielen (Grosse-Wilde et al. 2007; Forstner et al. 2009). Entsprechend belegen funktionelle Studien an *Drosophila*-Mutanten, dass der Pheromon-Rezeptor Or67d und das PBP Lush im Zusammenspiel die Erkennung des Pheromons 11-cis-Vaccenyl-Acetat ermöglichen (Xu et al. 2005; Ha und Smith 2006).

Vergleichende Untersuchungen der Struktur von Pheromon-freien und Pheromon-beladenen PBPs sprechen außerdem dafür, dass die Einlagerung des "richtigen" Liganden eine spezifische Konformationsänderung des Bindeproteins induziert (Mohl et al. 2002; Laughlin et al. 2008). Unklar ist allerdings, ob der Komplex aus Ligand und Bindeprotein dann den Rezeptor direkt aktiviert, oder ob das Pheromon erst durch eine erneute Konformationsänderung vom PBP freigesetzt werden muss, um dann allein den Rezeptor zu aktivieren. Für beide möglichen Mechanismen gibt es gegenwärtig unterstützende Befunde: Während bei Drosophila das PBP Lush in der Pheromon gebundenen Konformation das entsprechende sensorische Neuron aktivieren kann (Laughlin et al. 2008), wird eine der Rezeptoraktivierung vorausgehende Freisetzung des Pheromons durch Studien gestützt, die eine pH-Wert abhängige Konformationsänderung von Nachtfalter PBPs zeigen. Letztere könnte durch einen niedrigeren pH-Wert in der Nähe der Plasmamembran bewirkt werden (Wojtasek und Leal 1999). Für eine Bindung des freien Pheromons an den Rezeptor sprechen zudem auch funktionelle Untersuchungen von Pheromon- und Odorant-Rezeptoren in Zellkultur und an Oocyten des Krallenfroschs *Xenopus laevis*, wobei in diesen Studien eine Rezeptoraktivierung auch in der Abwesenheit vom Bindeprotein beobachtet werden konnte (Nakagawa et al. 2005; Grosse-Wilde et al. 2006; Mitsuno et al. 2008).

Sensory Neuron Membrane Proteins (SNMPs)

Die genauen Mechanismen der Interaktion von Pheromonen und Pheromon/PBP-Komplexen mit den Riechsinneszellen sind noch nicht abschließend geklärt. Neuere Studien ergaben jetzt zusätzlich überzeugende Indizien, dass bei der Pheromon-Registrierung auch die seit Langem bekannten sogenannten "Sensory Neuron Membrane Proteins" (SNMPs) eine bedeutsame Rolle spielen könnten. Das erste SNMP wurden bereits vor fast 15 Jahren in der dendritischen Membran Pheromon-sensitiver Neurone des Nachtfalters Antheraea polyphemus entdeckt (Rogers et al. 1997). SNMPs gehören zur diversen CD36-Familie, deren Mitglieder durch zwei Transmembrandomänen und eine große, extrazelluläre Bindedomäne gekennzeichnet sind. Den bislang funktionell charakterisierten CD36- Proteinen ist gemeinsam, dass sie hydrophobe Moleküle wie Cholesterin und Fettsäuren als auch Lipid/Protein-Komplexe erkennen, binden und transferieren (Silverstein und Febbraio 2009). Daher wird seit ihrer Entdeckung vermutet, dass SNMPs "Andockstellen" für

PBP/Pheromon-Komplexe in der Nähe von Pheromon-Rezeptoren (PRs) darstellen könnten und somit als Co-Rezeptoren fungieren, die das Pheromon "einfangen" und dann an den benachbarten PR "weiterreichen" (Vogt 2003). Tatsächlich zeigen jüngste Studien an Drosophila-Mutanten, dass SNMP1 für die Pheromonantwort eines sensorischen Neurons zwingend notwendig ist und dass das Protein innerhalb der Membran in unmittelbarer Nachbarschaft zum Pheromonrezeptor (Or67d) liegt (Benton et al. 2007). Daneben wurde SNMP1 bei Drosophila auch in den das Neuron umgebenden Stützzellen gefunden. Daher wird vermutet, dass das Protein in der Membran der Stützzellen eine andere Funktion ausübt und hier möglicherweise bei der Entfernung von hydrophoben Pheromonen oder Pheromon/PBP-Komplexen aus der Sensillenlymphe eine Rolle spielt.

Für den Nachtfalter *Heliothis virescens* wurde dagegen für den SNMP1-Typ eine ausschließliche Expression in olfaktorischen Neuronen und eine Co-Expression mit dem Sexualpheromon-Rezeptor HR13

nachgewiesen. Interessanterweise wurde bei H. virescens aber ein weiterer SNMP2-Subtyp gefunden, der nur in den nicht-neuronalen Stützzellen vorkommt (Forstner et al. 2008). Diese zelltypspezifische Expression der beiden Heliothis SNMP-Subtypen spricht für eine unterschiedliche Funktion der Proteine und könnte auf eine Weiterspezialisierung des Pheromonsystems bei Nachtfaltern hindeuten: Während für SNMP1 in der Dendritenmembran der Riechsinneszelle eine Interaktion mit Pheromon/PBP-Komplexen oder Pheromonen denkbar wäre, könnte SNMP2 in der Membran von Stützzellen an der "Clearance" der Sensillenlymphe beteiligt sein.

Odorant-Rezeptoren

In Hinblick auf die molekulare Erkennung und Unterscheidung von Duftstoffen sind die Rezeptorproteine in der dendritischen Membran von Riechsinneszellen Schlüsselelemente. Sie interagieren spezifisch mit den relevanten Duftstoffen oder Pheromonen und leiten die Umwandlung des chemischen Reizes in eine elektrische Antwort der Riechsinneszelle ein.

Odorant-Rezeptoren (ORs) wurden zunächst in Wirbeltieren entdeckt. In bahnbrechenden Arbeiten, die 2004 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet wurden, fanden Linda Buck und Richard Axel 1991 im Genom von Nagern eine riesige Familie mit mittlerweile mehr als tausend identifizierten Genen, die G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) mit typischen sieben Transmembrandomänen (7TMDs) kodieren und jeweils in Subpopulationen von Riechsinneszellen exprimiert werden (Buck und Axel 1991). Nachfolgend wurden funktionell entsprechende und ebenfalls sehr umfangreiche GPCR-Genfamilien beim Fadenwurm Caenorhabditis elegans (Nematoda) identifiziert, sowie GPCRs als mögliche Pheromon-Rezeptoren des Vomeronasalorgans von Nagern beschrieben.

Die Identifizierung von ORs der Insekten erwies sich als sehr schwierig. Alle initialen auf Homologie zu den OR-Sequenzen von Wirbeltieren und Nematoden basierenden Ansätze zeigten sich zunächst erfolglos.

Motorized Stereotaxic

The 3rd generation of stereotaxic instruments



- Atlas Integration
- High Accuracy
- High Reproducibility
- High Throughput

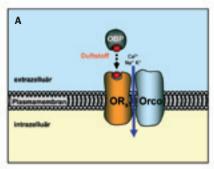
Smart Add-Ons

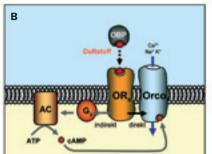
- Drill Robot
- Microinjection Robot
- Microdialysis Robot

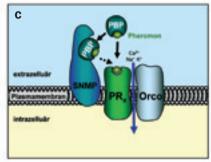


www.neurostar.de info@neurostar.de +49 7031 415065

Neuro *forum* 3/11 93







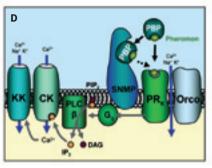


Abb. 3: Modelle der olfaktorischen Signaltransduktion bei Insekten A) In Riechsinneszellen, die auf generelle Duftstoffe reagieren, bildet ein spezifischer Odorant-Rezeptor (ORx) und der generelle Co-Rezeptor (Orco) einen Liganden-aktivierten Rezeptor/Ionenkanal-Komplex. Ein durch Odorant-Bindeprotein (OBP) herangeführtes Duftstoffmolekül bindet an die ORx-Untereinheit und bewirkt dadurch die Öffnung des nicht selektiven Kationenkanals (Sato et al. 2008). B) Nach Wicher et al. ist die variable ORx-Untereinheit ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor und Orco ein direkter und zyklisch-nukleotid-aktivierter Ionenkanal. In Anwesenheit einer hohen Konzentration eines generellen Duftstoffs kommt es über eine direkte ORx/Orco-Interaktion zur Öffnung des Orco-Kanals. Bei niedriger Duftstoffkonzentration schlägt das Modell eine indirekte Kanalöffnung vor. Der Rezeptor aktiviert zunächst ein G-Protein (G_s), welches über eine Adenylylzyklase (AC) zur Produktion von cAMP führt. Dieser sekundäre Botenstoff führt dann zur Öffnung des Orco-Kanals. C) In Pheromon-sensitiven Riechsinneszellen deuten die Befunde auf die Beteiligung eines "Sensory Neuron Membrane Proteins" (SNMP) bei der Signaltransduktion hin. Das SNMP könnte als Andockstelle für das Liganden-beladene Pheromon-Bindeprotein (PBP) dienen und/oder an der Freisetzung des Pheromons beteiligt sein. Nach Bindung des Pheromons an die PRx-Untereinheit kommt es zur Öffnung des Orco-Kanals. Alternativ wurde vorgeschlagen, dass die Bindung des PBP/Pheromon-Komplexes an SNMP eine Inhibition des Pheromon-Rezeptor (PRx)/Orco-Komplexes aufhebt und so ein Einstrom von Kationen in die Zelle ausgelöst wird (Ha und Smith 2009). D) Bei der Pheromon-Erkennung sprechen eine Reihe von Befunden auch für einen G-Protein-vermittelten Transduktionsweg (Stengl 2010). Eine Rezeptoraktivierung könnte demnach über ein G,-Protein eine Phosholipase C (PLCβ) aktivieren, welche Phosphoinositol-(4,5)-biphosphat (PIP₂) zu IP₃ und DAG umsetzt. IP3 öffnet zunächst einen Kalzium-selektiven Ionenkanal (CK); das einströmende

Kalzium schaltet dann nachfolgend weitere nicht-selektive Kationenkanäle (KK).

Der Durchbruch gelang erst 1999 nach Verfügbarkeit der Genomsequenz von *Drosophila melanogaster* und der Anwendung spezieller Suchprogramme für Proteine mit 7TMD in Kombination mit umfangreichen Sequenzierungen von differenziell exprimierten cDNAs der Antennen (Vosshall et al. 1999; Clyne et al. 1999). Dies führte zur Entdeckung einer diversen Familie von 7TMD-Rezeptoren, deren Mitglieder spezifisch in Riechsinneszellen der Antennen

und Maxillarpalpen exprimiert werden und hier in den sensorischen Dendriten der Zellen konzentriert sind.

Verglichen mit den mehr als tausend funktionellen OR-Genen, die im Genom einiger Wirbeltiere gefunden wurden, weist *Drosophila* mit 62 ORs eine eher geringe Anzahl auf. Inzwischen sind allerdings die Genome weiterer Insekten sequenziert und mit bioinformatischen Methoden auf die vorhandenen OR-Gene

untersucht worden. Relativ wenige OR-Gene wurden dabei auch bei der Malaria Mücke Anopheles gambiae (79 ORs) und dem Seidenspinner Bombyx mori (48 ORs) gefunden. Dagegen wurden weitaus mehr, nämlich 163 OR-Kandidaten im Genom der Honigbiene (Apis mellifera), 225 ORs in der Erzwespe (Nasonia vitripennis), 265 ORs beim Reismehlkäfer (Tribolium castaneum) und kürzlich mehr als 400 mögliche ORs bei der Feuerameise (Solenopsis invicta) identifiziert. Somit sind außerordentlich große Anzahlen verschiedener ORs offenbar keine Spezialität des Riechsystems der Wirbeltiere, sondern kommen auch im olfaktorischen System der Insekten vor. Warum die OR-Genfamilie in manchen Insektenarten (z. B. der Feuerameise) eine spezifische Expansion erfahren hat, ist bisher unklar. Es wird jedoch vermutet, dass sich in der Vielfalt an OR-Typen mancher Arten evolutionäre Anpassungen an besondere ökologische und physiologische Erfordernisse bei der Nahrungssuche oder die enorme Bedeutung von Duftstoffen für die soziale Kommunikation bei in Staaten lebenden Insekten widerspiegeln.

Funktionelle Analysen haben inzwischen für die meisten der 62 Drosophila ORs und viele Anopheles Rezeptoren gezeigt, dass sie für eine Duftstoffantwort von Riechsinneszellen unentbehrlich sind und die molekulare Grundlage für die in elektrophysiologischen Untersuchungen ermittelten Spezifitäten verschiedener Sinneszellpopulationen auf der Antenne darstellen (Kreher et al. 2005; Hallem und Carlson 2006; Carey et al. 2010; Wang et al. 2010). Hinsichtlich der Bandbreite ihrer Duftstoffspektren gleichen sich ORs von Insekten und Wirbeltieren. Auch weisen die Proteinsequenzen von Insekten- und Wirbeltier-ORs die für GPCRs typischen 7TMD auf. Allerdings enden hier die Gemeinsamkeiten.

Die OR-Proteine beider Tiergruppen zeigen keinerlei Sequenzähnlichkeit zueinander und sind phylogenetisch nicht miteinander verwandt. Darüber hinaus ergaben in vitro und in vivo Strukturanalysen überraschenderweise eine "umgekehrte" Membrantopologie der Rezeptorproteine von Insekten: Im Gegensatz zu den ORs von Wirbeltieren liegt bei den ORs der Insekten der N-Terminus intrazellulär und der C-Terminus außerhalb der Zelle (Abbildung 2) (Benton et al. 2006). Über diese fundamentalen Unterschiede ihrer ORs hinaus unterscheiden sich Riechsinneszellen von Insekten und Wirbeltieren in einem weiteren wesentlichen Punkt: Während Riechzellen von Wirbeltieren

nur einen OR-Subtyp pro Zelle aufweisen, belegen aktuelle Studien, dass in den meisten Riechsinneszellen der Insekten ein spezifischer Liganden-bindender OR-Typ als Heteromer mit einem zweiten, immer gleichen Co-Rezeptor aus der OR-Genfamilie vorliegt (Benton et al. 2006). Nach neuester Nomenklatur wird dieses Protein als Orco bezeichnet (Früher: Or83b bei Drosophila, OR2 oder OR7 bei anderen Insekten). Das Orco-Protein ist in vielerlei Hinsicht ungewöhnlich: Erstens ist es als einziges Mitglied der OR-Familie bei verschiedenen Insekten hochkonserviert und besitzt eine auffällig große intrazelluläre Domäne. Zweitens bindet es selbst keine Duftstoffe und ist für den Transfer des spezifischen OR-Typs zur dendritischen Membran notwendig. Und drittens bildet das Orco-Protein einen nicht-selektiven Kationenkanal, der nach neuesten Erkenntnissen an der Signaltransduktion (siehe unten) beteiligt ist (Krieger et al. 2003; Larsson et al. 2004; Jones et al. 2005; Benton et al. 2006).

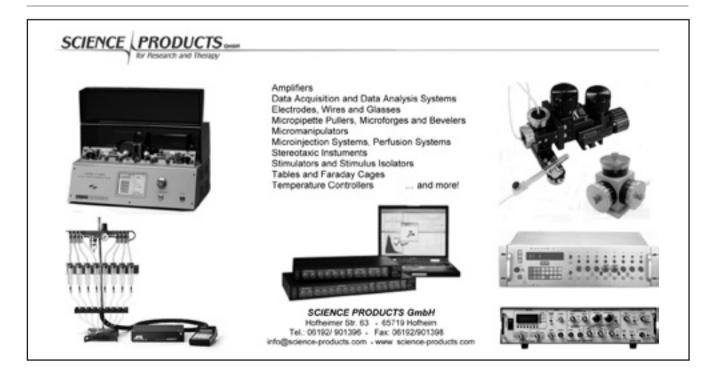
Pheromon-Rezeptoren

Die Gene für spezielle Pheromon-Rezeptoren (PR) von Insekten konnten erstmals für die Baumwolleule (*Heliothis virescens*) aufgeklärt werden (Krieger et al. 2004). Wie bei vielen Nachtfalterarten setzen die weiblichen Tiere ein komplexes Pheromongemisch aus einer Hauptkomponente und mehreren Nebenkomponenten frei, um die

Männchen anzulocken. Dies legte die Vermutung nahe, dass Pheromon-Rezeptoren vor allem auf der männlichen Antenne exprimiert werden. Durch Kombination von Genomanalysen mit bekannten OR-Sequenzen und "Screening" einer antennalen cDNA-Bibliothek gelang es, bei Heliothis Sequenzen für mehrere 7TMD-Rezeptoren zu isolieren, die vorwiegend in männlichen Antennen exprimiert wurden und in sensorischen Neuronen der Pheromon-sensitiven Riechhaare vorkamen. In funktionellen Studien an Rezeptor-exprimierenden Zelllinien zeigte sich, dass der HR13-Rezeptortyp durch die Hauptkomponente des weiblichen Sexualpheromons (Z)-11-Hexadecenal aktiviert wird (Grosse-Wilde et al. 2007). Nachfolgend gelang die Identifizierung des Bombykol-Rezeptors des chinesischen Seidenspinners Bombyx mori (Sakurai et al. 2004; Krieger et al. 2005). Inzwischen sind Sequenzen von PRs für eine Reihe weiterer Falterarten aufgeklärt. Pheromon-Rezeptoren gleichen in ihrem Aufbau den Odorant-Rezeptoren für generelle Duftstoffe (Abbildung 2) und kommen in Riechsinneszellen ebenfalls zusammen mit dem Orco-Protein vor. Innerhalb der ansonsten sehr diversen OR-Familie von Faltern bilden PRs bemerkenswerterweise eine separate Gruppe stärker konservierter Proteine (Krieger et al. 2004; Wanner et al. 2007). Diese Konservierung der PR-Aminosäuresequenzen bei verschiedenen Arten könnte eine Ursache in der chemischen Ähnlichkeit ihrer Pheromon-Liganden haben oder alternativ den hohen negativen evolutionären Selektionsdruck widerspiegeln, der auf dem hochspezifischen Pheromonerkennungssystem lastet und bestimmte Veränderungen am Rezeptorprotein auf Grund der Bedeutung für eine erfolgreiche Fortpflanzung nicht zulässt.

Ionotrope Rezeptoren

Eine völlig neue Klasse von möglichen Rezeptoren für Duftstoffe wurde kürzlich in den Antennen von Drosophila melanogaster (Benton et al. 2009) und einer Reihe anderer Insekten entdeckt (Croset et al. 2010). Diese Proteine gehören zu einer Subfamilie von sogenannten Ionotropen Rezeptoren (IRs), die in ihrem Aufbau fundamental verschieden von ORs und PRs sind (Abbildung 2). IRs sind sequenzund strukturverwandt zu den ionotropen Glutamat-Rezeptoren (iGluRs). Ihnen fehlen aber bestimmte Aminosäuren, die in iGluRs mit Glutamat interagieren. Zudem ist die entsprechende Liganden-Bindungregion der iGluRs in den IRs in Einklang mit einer möglichen Funktion als Bindungsstelle für diverse Duftstoffe extrem variabel. Aktuelle Studien zeigen eine Expression von IRs speziell in Riechsinneszellen der S. coeloconica, die keine anderen 7TMD-ORs exprimieren und eine Konzentration des IR-Proteins in den dendritischen Fortsätzen der sensorischen Neurone. Durch ..Miss"-Expression von IRs in einem anderen Riechsinneszelltvp.



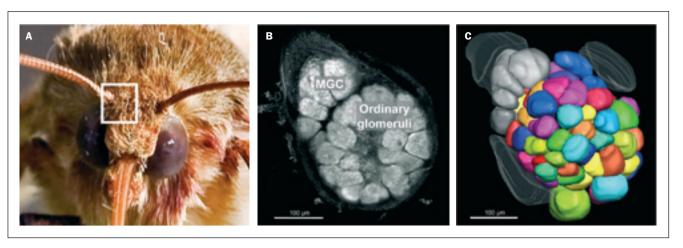


Abb. 4: Organisation des Antennallobus von Heliothis virescens

A) Frontalansicht des Kopfes. Die beiden Antennen gehen oberhalb der Facettenaugen von der Kopfkapsel ab. Die weiße Umrahmung kennzeichnet den Bereich in dem der linke Antennallobus im Innern des Kopfes liegt. B) Glomeruläre Strukturen im Antennallobus eines männlichen Nachtfalters. Diese rundlichen Neuropil-Strukturen werden aus den Endigungen von Riechsinneszellen und den Fortsätzen von Projektionsneuronen und lokalen Neuronen gebildet. Neben dem aus vier Glomeruli geformten Makroglomerulären Komplex (MGC), in dem eingehende Pheromonsignale prozessiert werden, ist eine Vielzahl von sogenannten "Ordinary glomeruli" zu erkennen, in denen "allgemeine" Duftstoffsignale verarbeitet werden. Um die glomerulären Strukturen darzustellen, wurde der Antennallobus mit einem Antikörper gegen ein synaptisches Protein "angefärbt" und ein "optischer Schnitt" mit einem konfokalen Laser Scanning-Mikroskop aufgenommen. C) 3D-Rekonstruktion des Antennallobus eines männlichen Nachtfalters. Die Rekonstruktion wurde aus optischen Schnittserien des in B gezeigten Antennallobus angefertigt. Der MGC ist in grau gezeigt. Die unterschiedlichen "Ordinary Glomeruli" sind in verschiedenen Farben dargestellt. Die Bilder wurden freundlicherweise von P.H. Olsen (A). B.B. Løfaldli (B und C) und H. Mustaparta (alle NTNU. Norwegen) zur Verfügung gestellt.

der diese Rezeptoren normalerweise nicht besitzt, konnte eine direkte Beteiligung von IRs an der Erkennung von distinkten Duftstoffen gezeigt werden. Interessanterweise werden 2-5 IR-Typen in einer Riechsinneszelle exprimiert. Entsprechend dem Orco-Protein in den OR-Zellen, gibt es auch besonders konservierte IR-Typen, die mit variableren IR-Typen heteromerisieren (Abuin et al. 2011).

Olfaktorische Signaltransduktion

Duftspezifische ORs, PRs und IRs sind die rezeptiven Proteine in der dendritischen Membran der Riechsinneszellen. Wie aber erfolgt nach Bindung eines adäquaten Liganden die Umwandlung des chemischen Duftstoffsignals in eine elektrische Zell-Antwort, d. h. eine Änderung des Membranpotenzials des sensorischen Neurons?

Für die speziellen Riechsinneszellen der *S. coeloconica* mit IR-Austattung zeigen die bisherigen funktioneller Studien, dass IRs selbst Duftstoff-aktivierte Ionenkanäle aus Kombinationen von zwei bis drei verschiedenen IR-Typen sind. Neben einem IR-Typ, der die Ligandenspezifität bestimmt, enthält das Heteromer ein oder zwei, teils immer gleiche IR-Typen, die als Co-Rezeptoren fungieren (Abuin et al. 2011). In Riechsinneszellen, so wird vermutet, führt die Bindung von Duftstoff an den Rezeptor/Ionenkanalkomplex, in

Analogie zu den IR-verwandten ionotropen Glutamat-Rezeptoren, zum Einstrom von Kationen und einer Depolarisation des sensorischen Neurons.

Für die auf den Antennen vorherrschenden Riechsinneszellen mit 7TMD-Odorant- bzw. Pheromon-Rezeptoren sind die molekularen Vorgänge bei der olfaktorischen Signaltransduktion allerdings noch weitgehend ungeklärt, da in der Literatur zum Teil kontroverse Befunde vorliegen. Neuere funktionelle Studien von zwei Arbeitsgruppen, die Kombinationen von einem Liganden-spezifischen Drosophila OR und dem Orco-Protein in Säugerzellen elektrophysiologisch untersuchten, sprechen übereinstimmend für einen durch Duftstoffe aktivierten heteromeren Rezeptor/Ionenkanalkomplex aus einer variablen OR-Untereinheit und dem konservierten Orco-Protein (Sato et al. 2008; Wicher et al. 2008). Uneinigkeit besteht allerdings darüber, ob ORs nur Untereinheiten von Liganden-aktivierten OR/ Orco-Kanälen darstellen, welche dann nach Duftstoffbindung öffnen und direkt eine Depolarisation der Riechsinneszellen bewirken ("ionotroper Signalweg"). Alternativ sind die ORs von Insekten auch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, welche nach ihrer Aktivierung nachgeschaltete intrazelluläre Reaktionskaskaden auslösen und die Bildung sekundärer Botenstoffe bewirken, die dann den Orco-Ionenkanal indirekt öffnen ("metabotroper Signalweg").

Die Ergebnisse von Sato et al. ergaben keine Hinweise auf eine Beteiligung von G-Proteinaktivierten Reaktionskaskaden und sprechen für einen reinen "ionotropen Signalweg" (Abbildung 3A). Diese Befunde wären im Einklang mit der vertretenen Ansicht, dass Insekten ORs keine GPCRs sein können, da ihnen jegliche Sequenzähnlichkeit zu den ORs von Wirbeltieren und Nematoden sowie zu anderen klassischen GPCRs fehlt und sie daneben auch noch durch eine "umgedrehte" Membrantopologie ausgezeichnet sind. Allerdings zeigen die Arbeiten von Wicher et al., dass die Duftstoffbindung an die OR-Untereinheit auch ein G.-Protein aktiviert und Orco zudem ein Ionenkanal ist, der durch cAMP, also einen klassischen sekundären Botenstoff, geöffnet werden kann. Das Modell dieser Gruppe schlägt daher die Existenz einer dualen (kombinierten) ionotropen und metabotropen Signaltransduktion vor (Abbildung 3B): Danach kommt es in Gegenwart hoher Duftstoffkonzentrationen zu einer direkten OR/Orco-Interaktion und damit zu einer schnellen Öffnung des Orco-Kanals, während bei niedrigen Duftstoffkonzentrationen der Liganden-spezifische OR eine G-Protein-Kaskade auslöst, die zur Bildung von cAMP führt, dass dann den Orco-Kanal öffnet. Diese langsamere, G-Protein-vermittelte Verstärkerkaskade könnte für eine hochsensitive Erkennung von Duftstoffen von außerordentlicher Wichtigkeit sein und wäre eine interessante

Analogie zum olfaktorischen System von Wirbeltieren: Hier führt die Bindung von Duftstoffen an Liganden-spezifische ORs ebenfalls über die Aktivierung eines G-Proteins (G_{olf}) und einer Adenylylzyklase zur Synthese von cAMP, welches einen cAMP-geschalteten Kationenkanal öffnet.

Hinsichtlich der Umwandlung von distinkten Pheromonsignalen haben Untersuchungen an Drosophila-Mutanten gezeigt, dass ein spezifischer Pheromon-Rezeptor, das Orco-Protein und das SNMP1 für eine elektrophysiologische Antwort der Riechsinneszelle zwingend notwendig sind. Basierend auf den neuesten Drosophila Daten wird dabei ein ausschließlich "ionotroper Signalweg" (Abbildung 3C) vorgeschlagen, der eine Beteiligung des SNMP1 Proteins einschließt, eine G-Protein-Aktivierung aber nicht annimmt. Dagegen sprechen biochemische, elektrophysiologische und genetische Untersuchungen der letzten 20 Jahre für die Existenz eines G-Protein-vermittelten metabotropen Mechanismus bei der Transduktion von Pheromonsignalen: Studien an verschiedenen Falterarten unterstützen dabei eine Pheromon-aktivierte IP₂-Signalkaskade in Pheromon-sensitiven Riechsinneszellen (Nakagawa und Vosshall 2009; Stengl 2010). In einem entsprechenden Modell, das versucht, die bisherigen experimentellen Befunde zu kombinieren (Abbildung 3D), wird vorgeschlagen, dass die Bindung eines Pheromonmoleküls an den spezifischen Pheromon-Rezeptor die Aktivierung eines G-Proteins und nachfolgend einer Phospholipase C (PLC) auslöst; dieses Enzym katalysiert die Hydrolyse von Phosphatidyl-4,5-bisphosphat zu Inositoltrisphosphat (IP₂) und Diacylglycerol (DAG). IP, öffnet dann einen Kalzium-(Ca²⁺)selektiven Ionenkanal, der dann über das einströmende Kalzium weitere nicht-selektive Kationenkanäle "schaltet" (Stengl 2010). Wie die Expression des cAMP-aktivierbaren Orco-Kanals in Pheromon-Sinneszellen mit dieser Signaltransduktionskaskade vereinbar ist, bleibt allerdings vorläufig unklar. Es wurde in diesem Zusammenhang allerdings vorgeschlagen, dass Orco in Riechsinneszellen nicht direkt an der Transduktion von Duftstoffsignalen beteiligt ist, sondern für die Einstellung der Spontanaktivität der Riechsinneszellen wesentlich sein könnte (Stengl 2010).

Insgesamt ergeben die bisherigen Befunde derzeit ein sehr uneinheitliches und komplexes Bild der olfaktorischen Signaltransduktion in Riechsinneszellen von Insekten. Weitere Experimente müssen deshalb zukünftig zeigen, in wieweit ionotrope und metabotrope Mechanismen allein und/oder in Kombination die Transduktion von Duftstoff- und Pheromonreizen vermitteln.

Die olfaktorische Bahn

Wie in den vorherigen Abschnitten erläutert, wird die Interaktion eines Duftmoleküls mit einem spezifischen Dufstoffrezeptor in eine neuronale Erregung der Riechsinneszelle umgewandelt. Diese Folge von Aktionspotenzialen wird über den Antennalnerv zur ersten Verschaltstation des Gehirns, dem Antennallobus weitergeleitet. Der Antennallobus stellt das primäre olfaktorische Neuropil zur Integration und Kodierung von Duftinformation dar und ähnelt im Aufbau dem primären olfaktorischen Zentrum von Wirbeltieren, dem Bulbus olfactorius (Hildebrand und Shepherd 1997). Das auffällige morphologische Merkmal ist eine Vielzahl von kugeligen Strukturen, sogenannten olfaktorischen Glomeruli (Abbildung 4). In ihnen werden die Axone der Riechsinneszellen synaptisch mit sogenannten Projektionsneuronen und einem Netzwerk von lokalen Interneuronen verschaltet. Für Drosophila und andere Insekten konnte bereits gezeigt werden, dass die Axone sensorischer Neurone, die den gleichen Duftstoffrezeptortyp exprimieren, in einem Glomerulus konvergieren und dass jeder Glomerulus in den meisten Fällen auch nur den afferenten Eingang eines Rezeptortyps erhält (Vosshall et al. 2000). Entsprechend wurde für einige Arten gefunden, dass die Anzahl an Glomeruli mit der Anzahl an verschiedenen Duftstoffrezeptortypen etwa 1:1 korreliert. Somit wird die Aktivität einer sensorischen Neuronenpopulation, die auf bestimmte Duftstoffe reagiert, in einem Glomerulus gebündelt. Die olfaktorischen Glomeruli stellen also nicht nur strukturelle, sondern auch funktionelle Einheiten der Duftkodierung dar. Die Anzahl der Glomeruli ist genetisch festgelegt und für jede Art spezifisch. Sie beträgt bei der Fruchtfliege ca. 50 Glomeruli, bei Nachtfaltern rund 60 und bei Honigbienen etwa 160. Bei manchen Ameisenarten wurden sogar mehr als 400 Glomeruli gefunden. Nicht nur die Anzahl der Glomeruli ist genetisch festgelegt, sondern auch ihre Größe und Position im Antennallobus. Dies hat es für viele Insektenarten basierend auf morphologischen Daten ermöglicht, einen digitalen, 3-D-Atlas des Antennallobus zu erstellen (Laissue et al. 1999; Berg et al. 2002). In Zusammenhang mit der Prozessierung von weiblichen Sexualpheromonsignalen zeigen die Männchen einiger Insekten, insbesondere vieler Falterarten wie z.B. dem Nachtfalter Heliothis virescens (Abbildung 4), eine interessante Besonderheit: Wenn man die Antennalloben zwischen Männchen und Weibchen vergleicht, so findet man bei den Männchen spezielle Glomeruli, welche separat am Eingang des Antennalnerven sitzen und wesentlich größer sind als die restlichen Glomeruli (Abbildung 4B und C). Dieser sogenannte macroglomeruläre Komplex (MGC) erhält und kodiert die Aktivität von den Pheromon-sensitiven Riechsinneszellen. Für viele Falterarten konnten verschiedene Komponenten des Sexual-



Neuro *forum* 3/11 97

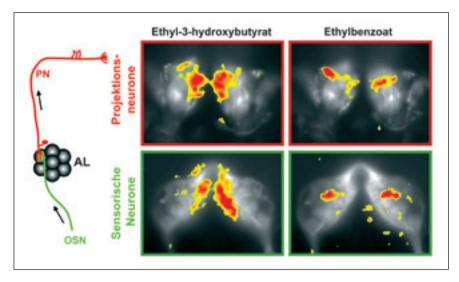


Abb. 5: Duftrepräsentation in den Eingangs- und Ausgangsneuronen des Antennallobus von *Drosophila*

Das Kalzium-sensitive Protein G-CaMP wurde selektiv in den sensorischen Neuronen (unten) oder den Projektionsneuronen (oben) exprimiert. Die Kalzium-Signale zu zwei verschiedenen Düften wurden auf die morphologischen Bilder des Antennallobus überlagert. Rot zeigt einen starken, gelb einen mittelstarken Anstieg der intrazellulären Kalzium-Konzentration (schwächere Kalzium-Signale wurden "abgeschnitten"). Beide Düfte aktivieren eine spezifische Kombination von Glomeruli. Die Muster des rechten und linken Antennallobus sind bilateral symmetrisch. Ein Vergleich der Aktivitätsmuster zwischen den beiden Verarbeitungsebenen zeigt ähnliche, jedoch keine identischen Muster.

pheromongemisches charakterisiert und ihre Kodierung distinkten Glomeruli des MGC zugeordnet werden. Für *Drosophila* hingegen konnte bisher nur eine Substanz, das 11-cis-Vaccenyl-Acetat als Sexualpheromon identifiziert werden. Auch weist der Antennallobus der Tiere keinen den Faltern vergleichbaren MGC auf. Dennoch ist man sich einig, dass weitere Pheromonkomponenten auch für *Drosophila* existieren. Somit ist die Detektion von Pheromonen nicht notwendigerweise mit dem Vorhandensein eines MGC gekoppelt.

Der Antennallobus erhält den Eingang von den sensorischen Neuronen und beherbergt ein komplexes neuronales Netzwerk, in dem viele sensorische Neurone auf wenige Antennallobus-Ausgangsneurone, den Projektionsneuronen, konvergieren. In jedem einzelnen Glomerulus sind die Terminalen der Riechsinneszellen und Projektionsneurone mit einem weiteren Neuronentyp des Antennallobus, den sogenannten lokalen Interneuronen verknüpft. Die lokalen Interneurone beschränken ihre Verzweigungen auf den Antennallobus und stellen mit ihren Verzweigungen zahlreiche Verbindungen zwischen den verschiedenen Glomeruli her. Bei Drosophila wurden hemmende (GABAerge) als auch erregende (cholinerge) lokale Interneurone beschrieben. Bei anderen Insektenarten, wie Nachtfaltern und Honigbienen, sind bisher aber nur hemmende lokale Interneurone bekannt. Die

lokalen Interneurone verarbeiten und transformieren die eingehende Duftinformation von den Riechsinneszellen der Antennen und bestimmen wesentlich die Ausgangssignale der einzelnen Glomeruli. Diese integrierte Duftinformation wird von uni- und multiglomerulären Projektionsneuronen abgegriffen, welche nur einen oder mehrere Glomeruli innervieren. Die Projektionsneurone leiten die Duftinformation in höhere Gehirnzentren, wie das laterale Protocerebrum und die Pilzkörper weiter, wo die Duftwahrnehmung stattfindet.

Repräsentation von Düften im Gehirn

Wie werden nun Düfte auf den verschiedenen Verarbeitungsebenen des Antennallobus repräsentiert und verarbeitet? Funktionelle Kalzium-Imaging-Studien an Honigbienen konnten einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der olfaktorischen Kodierung im Gehirn leisten (Joerges et al. 1997; Galizia et al. 1999; Sachse et al. 1999; Galizia und Menzel 2000). Die Methode beruht darauf, dass das Gehirn mit einem Kalzium-sensitiven Farbstoff gefärbt wird, welcher seine Fluoreszenz Kalzium-abhängig verändert. Kalzium eignet sich sehr gut als Indikator für neuronale Aktivität, da Kalzium als sekundärer Botenstoff in eine Reihe von Signalkaskaden involviert ist und auch bei der synaptischen Übertragung eine wichtige Rolle spielt. Das funktionelle Imaging erlaubt die neuronale Aktivität im Gehirn mittels einer hochsensitiven Kamera an verschiedenen Orten gleichzeitig zu messen. Dadurch eröffnet sich die räumliche und zeitliche Aktivität der Neurone, die an der Kodierung eines Dufteindrucks beteiligt sind. Die Studien an der Honigbeine konnten zeigen, dass eine Duftstoffstimulation ein reproduzierbares raum-zeitliches Aktivitätsmuster im Antennallobus hervorruft (Sachse et al. 1999). Jeder Duftstoff aktiviert eine spezifische Kombination an Glomeruli, wobei jeder Glomerulus auch durch mehrere Duftstoffe aktiviert werden kann. Das olfaktorische System hat somit eine kombinatorische Strategie entwickelt, mit der die enorme Vielfalt an Düften mit nur wenigen Kodierungseinheiten, den Glomeruli, repräsentiert werden kann. Diese duftspezifischen Muster sind bilateral symmetrisch und zwischen verschiedenen Individuen einer Art gleich (Galizia et al. 1999), d.h. die Duftmuster sind genetisch determiniert.

In den letzten Jahren konnte das funktionelle Imaging auch für das olfaktorische System der Fruchtfliege Drosophila melanogaster etabliert werden (Fiala et al. 2002). Bei Fruchtfliegen sind darüber hinaus viele molekulargenetische Techniken etabliert, welche die Fruchtfliege zu einem genetisch hervorragend manipulierbaren Modellorganismus gemacht haben. Mithilfe des GAL-UAS-Systems beispielsweise können spezifische Genprodukte ektopisch in Subpopulationen einzelner Neurone exprimiert werden. Dieses System ermöglicht es, dass ein Kalzium-sensitives Protein, wie z. B. das GFP-Derivat G-CaMP, selektiv in den Riechsinneszellen oder in den Projektionsneuronen des olfaktorischen Systems von Drosophila exprimiert wird (Abbildung 5). Es kann somit die Repräsentation von Düften auf den verschiedenen Verarbeitungsebenen des Antennallobus visualisiert werden. Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass auch bei der Fruchtfliege Düfte ein reproduzierbares und kombinatorisches Aktivitätsmuster sowohl in den sensorischen Neuronen als auch in den Projektionsneuronen hervorrufen (Abbildung 5) und unterstreichen, dass die kombinatorische Duftstoffkodierung ein generelles Prinzip im Riechsystem von Insekten ist.

Verarbeitung im Antennallobus-Netzwerk

Da der Antennallobus ein komplexes Netzwerk exzitatorischer als auch inhibitorischer Schaltkreise darstellt, ergibt sich die Frage wie die Duftrepräsentation des Eingangs, d.h. der sensorischen Neurone, in eine Ausgangsrepräsentation in den Projektionsneuronen

umgewandelt wird. Vergleicht man die Repräsentation von Düften in den sensorischen Neuronen mit der Repräsentation in den Projektionsneuronen (in Abbildung 5) so sieht man, dass die Aktivitätsmuster ähnlich, jedoch nicht identisch sind. Viele Studien haben sich bereits der Frage nach der Eingangs/Ausgangs-Beziehung im Antennallobus gewidmet und sind zu teilweise kontroversen Ergebnissen gekommen. Während die Imaging-Daten an Honigbienen zeigen, dass die Aktivitätsmuster der Projektionsneurone im Vergleich zu dem Eingangsmuster der Riechsinneszellen kontrastverstärkt und verschärft sind (Sachse und Galizia 2002), so lassen andere Studien darauf schließen, dass die Kalzium-Signale der sensorischen Neurone und der Ausgangsneurone bei Fruchtfliegen identisch sind (Ng et al. 2002; Wang et al. 2003). Jedoch zeigt eine weitere Studie an Fruchtfliegen, bei der einzelne Projektionsneurone und einzelne Sensillen mit sensorischen Neuronen elektrophysiologisch abgeleitet wurden, dass die Antworten der Projektionsneurone unspezifischer, d.h. breiter sind, als die der sensorischen Neurone, die denselben Glomerulus innervieren (Wilson et al. 2004). Darüber hinaus ergaben neuere Untersuchungen an Drosophila, dass die sensorischen Neurone auch präsynaptisch durch GABA inhibiert werden und schlagen einen "gain-control" Mechanismus vor, der die Erregungsübertragung von den Riechsinneszellen auf die nachgeschalteten Projektionsneurone moduliert (Olsen und Wilson 2008). Tatsächlich zeigt sich in Drosophila, dass verschiedene Glomeruli je nach Duft unterschiedlich im Netzwerk moduliert werden (Silbering et al. 2008).

Bezüglich der synaptischen Verknüpfungen in einem einzelnen Glomerulus sind grundlegende Studien an Schaben durchgeführt worden (Distler und Boeckh 1996; Distler und Boeckh 1997a; Distler und Boeckh 1997b). Gestützt durch Befunde aktueller Arbeiten an anderen Insekten zeigt sich, dass alle Neuronentypen im Antennallobus synaptisch miteinander verschaltet sind (Abbildung 6): Die Riechsinneszellen sind cholinerge Neurone und geben die Duftinformation an Projektionsneurone als auch lokale Interneurone weiter. Außerdem erhalten die sensorischen Neurone die bereits oben erwähnte präsynaptische Inhibition von hemmenden, d.h. GABAergen lokalen Interneuronen. Die lokalen Interneurone wiederum sind mit den sensorischen Neuronen, anderen lokalen Interneuronen und den Projektionsneuronen verschaltet. Die einzige synaptische Verbindung, die bisher nicht gefunden wurde, ist eine Verschaltung von den Projektionsneuronen zurück auf die sensorischen Eingangsneurone.

Interessanterweise konnte kürzlich erstmals gezeigt werden, dass die exzitatorischen lokalen Interneurone in *Drosophila* über elektrische Synapsen die Projektionsneurone und inhibitorischen lokalen Interneurone erregen und zu einer lateralen Exzitation zwischen den Glomeruli im Antennallobus führen (Huang et al. 2010; Yaksi und Wilson 2010) (Abbildung 6). Diese neuen Erkenntnisse erklären zum einen, warum die Duftrepräsentation in den Projektionsneuronen in *Drosophila* im Vergleich zu den Eingangsneuronen breiter ist. Zum anderen könnte durch diese laterale Exzitation die Sensitivität für schwach konzentrierte Düfte erhöht werden, wohingegen starke Düfte durch den inhibitorischen "gain control" Mechanismus spezifisch abgeschwächt werden.

Aufgrund der bisherigen Studien mit unterschiedlichen Techniken, Analysemethoden und Versuchstieren und den teilweise kontroversen Ergebnissen, lässt sich abschließend kein einheitliches Modell erstellen, wie der Antennallobus den afferenten Eingang der Riechsinneszellen verarbeitet. Die aktuellen Befunde zeigen aber bereits eindrucksvoll, wie das Antennallobus-Netzwerk das Eingangssignal der sensorischen Neurone durch intra- und interglomeruläre Interaktionen umfangreich transformiert, um daraus ein Ausgangssignal zu generieren, welches in höheren Hirnzentren weiterverarbeitet wird und letztlich eine zuverlässige Erkennung, Diskriminierung und Wahrnehmung von Düften gewährleistet.

Literatur

Benton, R., Vannice, K.S., Gomez-Diaz, C. und Vosshall, L.B. (2009): Variant ionotropic glutamate receptors as chemosensory receptors in Drosophila. *Cell* 136: 149-162.

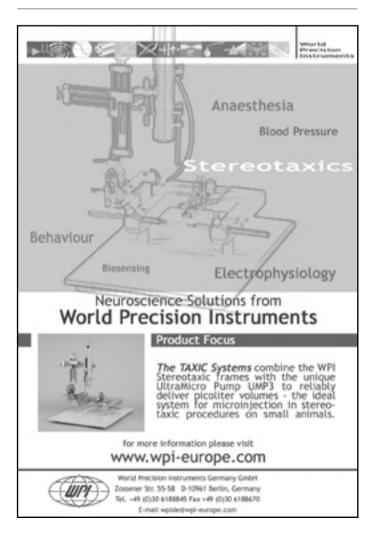
Fiala, A., Spall, T., Diegelmann, S., Eisermann, B., Sachse, S., Devaud, J.M., Buchner, E. und Galizia, C.G. (2002): Genetically expressed cameleon in *Drosophila melanogaster* is used to visualize olfactory information in projection neurons. *Curr Biol* 12: 1877-1884.

Forstner, M., Breer, H. und Krieger, J. (2009): A receptor and binding protein interplay in the detection of a distinct pheromone component in the silkmoth *Antheraea polyphemus*. *Int J Biol Sci* 5: 745-757.

Forstner, M., Gohl, T., Gondesen, I., Raming, K., Breer, H. und Krieger, J. (2008): Differential expression of SNMP-1 and SNMP-2 proteins in pheromonesensitive hairs of moths. *Chem Senses* 33: 291-299.

Galizia, C.G. und Menzel, R. (2000): Probing the olfactory code. *Nat Neurosci* 3: 853-854.

Galizia, C.G., Sachse, S., Rappert, A. und Menzel, R. (1999): The glomerular



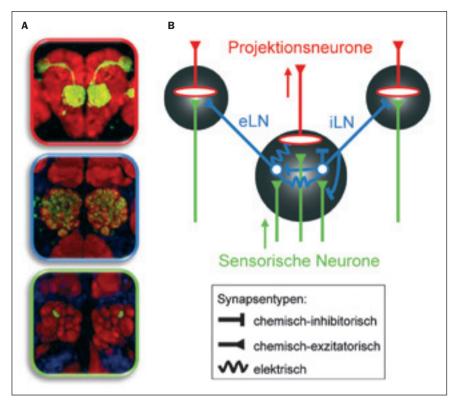


Abb. 6: Verschaltungsmodell des Antennallobus

A) Morphologische Bilder der drei Neuronentypen im Antennallobus von *Drosophila*, bei denen die sensorischen Neurone (unten), die inhibitorischen lokalen Interneurone (mitte) oder die Projektionsneurone (oben) jeweils grün markiert sind; das restliche Neuropil ist in rot gefärbt. B) Modell der bisher identifizierten synaptischen Verknüpfungen im Antennallobus zwischen den sensorischen Neuronen (grün), den exzitatorischen als auch inhibitorischen lokalen Interneuronen (blau; iLN, eLN) und den Projektionsneuronen (rot). Die sensorischen Neurone formen chemisch-exzitatorische Synapsen mit den Projektionsneuronen und beiden Typen von lokalen Interneuronen. Die inhibitorischen lokalen Interneurone hemmen die Projektionsneurone, die sensorischen Neurone (präsynaptische Inhibition) als auch andere Glomeruli über chemisch-inhibitorische Synapsen. Die exzitatorischen lokalen Interneurone erregen andere Glomeruli mit chemisch-exzitatorischen Synapsen. Sie besitzen außerdem elektrische Synapsen, mit denen sie die Projektionsneurone und die inhibitorischen lokalen Interneurone modulieren.

code for odor representation is species specific in the honeybee *Apis mellifera*. *Nat Neurosci* 2: 473-478.

Ha, T.S. und Smith, D.P. (2009): Odorant and pheromone receptors in insects. Front Cell Neurosci 3: 10.

Krieger, J., Grosse-Wilde, E., Gohl, T., Dewer, Y.M.E., Raming, K. und Breer, H. (2004): Genes encoding candidate pheromone receptors in a moth (*Heliothis virescens*). Proc Natl Acad Sci USA 101: 11845-11850.

Laissue, P.P., Reiter, C., Hiesinger, P.R., Halter, S., Fischbach, K.F. und Stocker, R.F. (1999): Threedimensional reconstruction of the antennal lobe in *Drosophila melanogaster. Journal of Compara*tive Neurology 405: 543-552.

Olsen, S.R. und Wilson, R.I. (2008): Lateral presynaptic inhibition mediates gain control in an olfactory circuit. *Nature* 452: 956-960.

Sachse, S. und Galizia, C.G. (2002): Role of inhibition for temporal and spatial odor representation

in olfactory output neurons: a calcium imaging study. *J Neurophysiol* 87: 1106-1117.

Sachse, S., Rappert, A. und Galizia, C.G. (1999): The spatial representation of chemical structures in the antennal lobe of honeybees: steps towards the olfactory code. *Eur J Neurosci* 11: 3970-3982.

Sato, K., Pellegrino, M., Nakagawa, T., Nakagawa, T., Vosshall, L.B. und Touhara, K. (2008): Insect olfactory receptors are heteromeric ligand-gated ion channels. *Nature* 452: 1002-1006.

Silbering, A.F., Okada, R., Ito, K. und Galizia, C.G. (2008): Olfactory information processing in the *Drosophila* antennal lobe: Anything goes? *J. Neurosci.* 28: 13075-13087.

Stengl, M. (2010): Pheromone transduction in moths. *Front Cell Neurosci* 4: 133.

Vosshall, L.B., Wong, A.M. und Axel, R. (2000): An olfactory sensory map in the fly brain. *Cell* 102: 147-159.

Wang, J.W., Wong, A.M., Flores, J., Vosshall, L.B. und Axel, R. (2003): Two-photon calcium imag-

ing reveals an odor-evoked map of activity in the fly brain. *Cell* 112: 271-282.

Wicher, D., Schafer, R., Bauernfeind, R., Stensmyr, M.C., Heller, R., Heinemann, S.H. und Hansson, B.S. (2008): Drosophila odorant receptors are both ligand-gated and cyclic-nucleotide-activated cation channels. *Nature* 452: 1007-1011.

Wilson, R.I., Turner, G.C. und Laurent, G. (2004): Transformation of olfactory representations in the *Drosophila* antennal lobe. *Science* 303: 366-370.

Yaksi, E. und Wilson, R.I. (2010): Electrical coupling between olfactory glomeruli. *Neuron* 67: 1034-1047.

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

Kurzbiografien

Silke Sachse studierte Biologie an der Freien Universität Berlin und promovierte 2002 in der AG von Prof. Dr. C. Giovanni Galizia an der FU Berlin. Anschließend arbeitete sie von 2002 bis 2005 als Post-Doc an der Rockefeller University in New York im Labor von Prof. Dr. Leslie B. Vosshall. Nach der Post-Doc Zeit wurde sie Gruppenleiterin am Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie in Jena in der Abteilung von Prof. Dr. Bill. S. Hansson. Seit 2008 leitet sie eine durch das BMBF geförderte selbstständige Nachwuchsgruppe.

Jürgen Krieger studierte Biologie an der Universität Osnabrück. Promotion 1991 am Lehrstuhl für Zoophysiologie der Universität Hohenheim, betreut durch Prof. Dr. Heinz Breer. Nach einer Post-Doc Zeit ist er seit 1995 akademischer Rat im Institut für Physiologie der Universität Hohenheim. Seit 2002 ist er Leiter der AG "Chemorezeption bei Insekten". 2008 habilitierte er an der Universität Hohenheim.

Korrespondenzadressen

Dr. Silke Sachse

Max Planck Institut für Chemische Ökologie Abt. Evolutionäre Neuroethologie Hans-Knöll-Straße 8, 07745 Jena

Tel.: +49 3641 5714-16, Fax: +49 3641 5714-02 E-Mail: ssachse@ice.mpg.de

PD. Dr. Jürgen Krieger

Universität Hohenheim Institut für Physiologie (230) Garbenstr. 30, 70599 Stuttgart

Tel.: +49 711 459 222-65 Fax: +49 711 459 237-26

E-Mail: juergen.krieger@uni-hohenheim.de



Spektrum Sachbücher

Bildungsfutter und Lesespaß in einem!

► Aktuelle Neuerscheinungen

► Die neue Welt der personalisierten Medizin



1. Aufl. 2011, 360 S., 34 Abb., geb. m. SU ISBN 978-3-8274-2777-9

► (D) 24,95 | € (A) 25,65 | *sFr 33,50

Francis S. Collins

Meine Gene – mein Leben

Passgenaue Diagnosen, individuell abgestimmte Therapien, eine für den Einzelnen maßgeschneiderte Medizin? Das ist keine ferne Vision mehr. Forschungsarbeiten in Hunderten von Laboratorien auf der ganzen Welt haben den Grundstein für eine wissenschaftliche und medizinische Revolution gelegt, die sich immer deutlicher abzeichnet – die personalisierte Medizin. Sie wird unseren individuellen, aber auch den gesellschaftlichen Umgang mit Gesundheit und Krankheit verändern. Für viele Menschen ist das hereits heute der Fall Francis Collins' Buch ist eine Einladung, sich mit dieser neuen Welt - ihren Grundlagen wie ihren Perspektiven - auseinanderzusetzen.



Francis S. Collins ist Direktor der National Institutes of Health (NIH) in Bethesda, Maryland. Er ist ein Pionier der Genforschung und war 15 Jahre lang Direktor des National Human Genome Research Institute an den NIH. Warum wir Gesellschaft so sehr brauchen



1. Aufl. 2011, 385 S., 15 Abb., kart. ISBN 978-3-8274-2864-6

► € (D) 19,95 | € (A) 20,51 | *sFr 27,-

John T. Cacioppo / William Patrick

Einsamkeit

Einsamkeit ist ein erstaunlich verbreitetes und für die Betroffenen wie auch für die Gesellschaft sehr ernstes Problem. Einfühlsam und sehr fachkundig erläutern John Cacioppo, der weltweit bedeutendste Forscher zum Thema "Einsamkeit", und William Patrick in diesem Buch, wie Einsamkeit entsteht und welche negativen Auswirkungen das Gefühl der Einsamkeit zur Folge haben kann. Sie zeigen aber auch auf, wie man ihr entrinnen kann.

► Was es heißt, verrückt zu sein ...



Der Sinn des Wahnstons

1.Aufl. 2011, 230 S., 5 Abb., kart. ISBN 978-3-8274-2773-1 ▶ € (D) 16,95 | € (A) 17,43 | *sFr 23,–

Neel Burton

Der Sinn des Wahnsinns

Die Zahl psychischer Erkrankungen nimmt vor allem in den Industrieländern stetig zu. Das Buch von Neel Burton, das mit zahlreichen literarisch-philosophischen Bezügen durchsetzt ist, beschreibt und erläutert die wichtigsten dieser Störungen und rückt sie zugleich in ein neues Licht: Könnte der "Wahnsinn" einen tieferen Sinn für uns Menschen haben?

Der ganze Sternhimmel auf dem Wohnzimmertisch



Außergewöhnlicher großformatiger Text-Bild-Band

Hochwertige Leinenbindung mit Deckenprägung

1. Aufl. 2011, 120 S., 204 Abb. Geb. Format: 40 cm × 50 cm ISBN 978-3-8274-2860-8

► € (D) 129,95 | € (A) 133,59 | *sFr 174,50

Eckhard Slawik

Der Sternenhimmel

Sonne, Mond und Sterne sind jedem seit Kindertagen vertraut, aber was für Schauspiele sie uns bieten können, lässt sich nur entdecken, wenn man zur richtigen Zeit am richtigen Ort ist. Oder sich Eckhard Slawiks überwältigend großformatiges Fotobuch vom Sternenhimmel auf den Tisch legt, um alles zu sehen, was man jemals sehen könnte: Sonne und Mond aus der Nähe, alle Sternbilder auf einen Blick, die Milchstraße und die nächsten Galaxien und natürlich: Myriaden von Sternen.

Man braucht sich nur von den Bildern und den einfachen Texterläuterungen dieses stellaren Routenplaners führen

zu lassen, um diese Entdeckungsreise jederzeit im Freien fortsetzen zu können.



