



Ein kleiner Wurm – Liebling der Optogenetiker

»Caenorhabditis elegans« als Modell
für synaptische Reizleitung und Arrhythmie

von Alexander Gottschalk

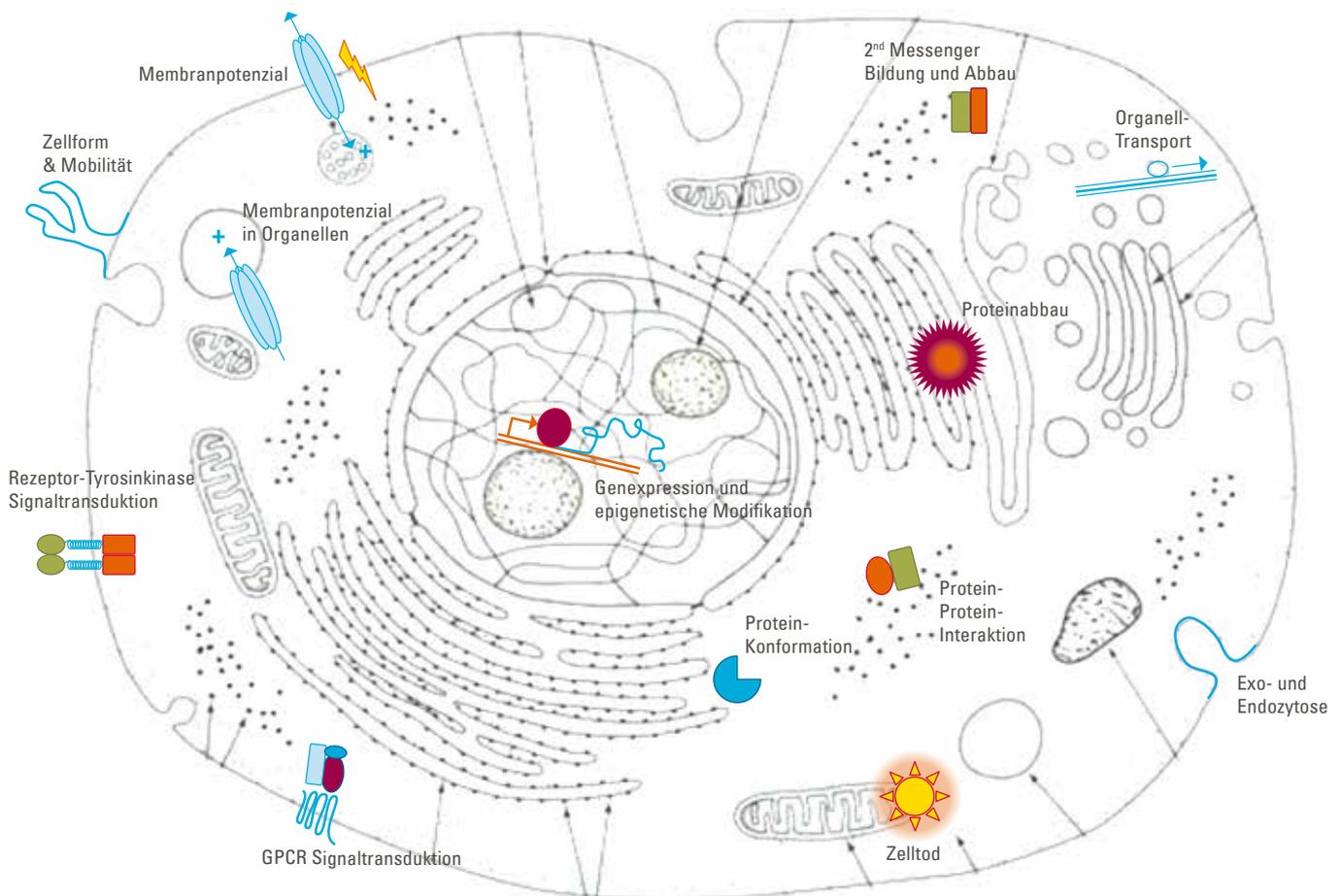
Der unscheinbare Fadenwurm »C. elegans« ist einer der ersten und bis heute wichtigsten Modellorganismen der Optogenetik. Zwei Frankfurter Arbeitsgruppen gelang es vor zehn Jahren erstmals, das Tier genetisch mit lichtaktivierbaren Ionenkanälen auszustatten und seine Bewegungen mit Licht zu steuern. Inzwischen studieren Forscher an dem durchsichtigen Wurm auch Prozesse, die für die medizinische Forschung bedeutsam sind – etwa die Entstehung und Behandlung genetisch bedingter Herz-Rhythmus-Störungen.

Seit der grundlegenden Entdeckung des lichtaktivierbaren Ionenkanals Channelrhodopsin in Frankfurt im Jahr 2002 hat sich die Optogenetik explosiv entwickelt und die neuro- und zellbiologische Forschungslandschaft weltweit revolutioniert [siehe Ernst Bamberg: » Licht steuert Nervenzellen mit höchster Präzision«, Seite 42]. Die Optogenetik verwendet natürliche oder maßgeschneiderte lichtempfindliche Proteine, um die Aktivität von (Nerven-)Zellen oder Vorgänge innerhalb der Zelle zu verändern. Dabei geht es nicht mehr nur darum, Nervenzellen anzuregen oder zu hemmen. Inzwischen ist auch die viel weiter reichende Modulierung von biologischen Vorgängen oder die Steuerung von biochemischen

Reaktionen möglich. Man kann die Form des Zytoskeletts und der Zellen selbst verändern, den intrazellulären Transport und Protein-Protein-Interaktionen beeinflussen, Strukturen von Proteinen verändern, die Expression und den Abbau von Proteinen steuern und sogar den Zelltod herbeiführen (*Abb. 1*). Auch therapeutische Anwendungen der Optogenetik zur Wiederherstellung von Seh- oder Hörvermögen rücken in den Bereich des Möglichen.

Derzeit gehören die breiteren Anwendungen optogenetischer Methoden noch in den Bereich der Grundlagenforschung. Um optogenetisch wirksame Proteine verwenden zu können, müssen zwei Voraussetzungen erfüllt sein: Der gewählte Modellorganismus sollte genetisch veränderbar

Anwendungsmöglichkeiten der Optogenetik in der Zelle



sein, und zwar möglichst in einer zellspezifischen Weise. Zweitens muss man die Zellen, deren Aktivität man verändern möchte, beleuchten können. Beides ist in besonderer Weise im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* gegeben. Er ist ein beliebter Modellorganismus in der Neuro- und Zellbiologie, denn er hat einen einfachen Körperbau, lässt sich im Labor gut halten, hat eine kurze Generationszeit von nur 2,5 Tagen und besitzt ein wohldefiniertes, sehr kleines Nervensystem von genau 302 Neuronen. Vor allem aber ist das Tier transparent und somit optimal beleuchtbar.

Meine Arbeitsgruppe befasst sich seit 2004 mit der Optogenetik. 2005 erzeugten wir (mit Georg Nagel und Ernst Bamberg) das erste Tier, das Channelrhodopsin transgen exprimiert, und konnten durch Licht koordiniertes Tierverhalten auslösen (Nagel et al. 2005). 2007 folgte dann die erste Anwendung von Halorhodopsin, mit dem Nervenzellaktivität in einem Tier unterdrückt wurde (Zhang et al. 2007). Seitdem haben wir mannigfaltige Varianten dieser Licht-Aktivatoren und -Inhibitoren in *C. elegans* implementiert, ebenso verschiedene Klassen lichtaktivierter Enzyme, welche wichtige zelluläre Botenstoffe erzeugen oder abbauen können (Weissenberger et al. 2011; Husson et al. 2012a; AzimiHashemi et al.

2014; Gao et al. 2015). Auch konnten wir den optogenetischen Aktivator Channelrhodopsin mit einem opt(ogenet)ischen Sensor für neuronale Aktivität kombinieren, so dass rein optische Veränderungen und Messungen von neuronaler und/oder Muskel-Aktivität möglich wurden (Akerboom et al. 2013; Wabnig et al. 2015).

Die Funktion einzelner Nervenzellen entschlüsseln

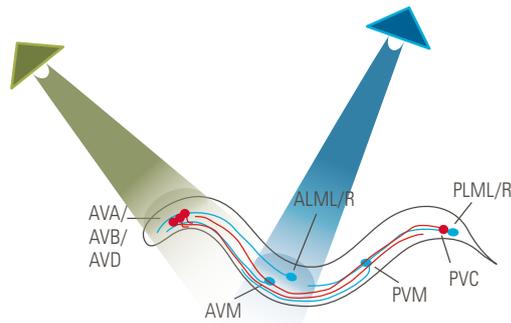
In *C. elegans* erfüllt jede der 302 Nervenzellen eine genetisch festgelegte Funktion und diese ist bei allen Individuen gleich. Um die Funktion der einzelnen Nervenzellen verstehen zu können, bringen wir optogenetische Aktivatoren und Inhibitoren gezielt in diese ein. So können wir sie aktivieren oder hemmen und mögliche Auswirkungen auf das Tierverhalten beobachten und quantifizieren. Es ist auch möglich, einzelne Nervenzel-

AUF DEN PUNKT GEBRACHT

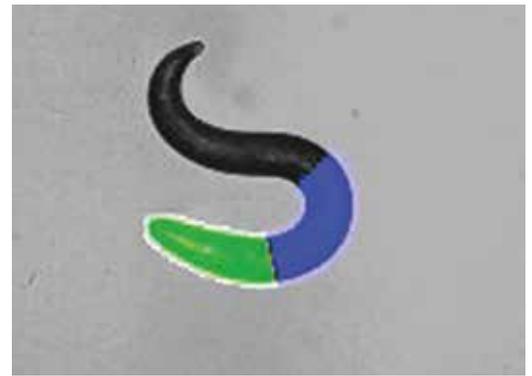
- »C. elegans« hat ein einfaches Nervensystem mit nur 302 Neuronen. Mithilfe lichtaktivierbarer Proteine konnte die Gruppe von Alexander Gottschalk aufklären, wie einzelne Nervenzellen die Bewegung des Tiers steuern.
- Auch die Ausschüttung von Neurotransmittern am synaptischen Spalt lässt sich optogenetisch steuern und untersuchen. Insbesondere wie Proteine den Nervenzellen helfen, sich nach starker Stimulation zu erholen.
- Das Fressorgan von »C. elegans« ist ein gutes Modell für die Untersuchung des Herzens von Säugetieren. An ihm lassen sich Wirkstoffe für genetisch bedingte Herz-Rhythmus-Störungen testen.

Optogenetisches Experiment zur Kontrolle des Wurmverhaltens

2a Nervenzellen von »C. elegans« (Berührungssensoren: blau; Bewegungsneurone: rot) enthalten verschiedene optogenetische Proteine, zur Anregung (blaues Licht) oder zur Inhibition (grünes Licht).



2a



2b

2b Einzelbild aus einem Video, welches ein Tier zeigt, in dem die beiden Zellsorten gerade optogenetisch manipuliert werden. Lichtmuster entsprechender Farbe werden auf den Wurm projiziert.

Chemische Synapsen unter dem Elektronenmikroskop, vor und nach optogenetischer Stimulation

3a Ein Querschnitt durch eine unstimulierte Synapse, in der »gedockte« synaptische Vesikel (Dreiecke) und das Zentrum der »aktiven Zone« (weißer Pfeil) zu sehen sind. Die Synapse ist von einer Membran umgeben.

3b Eine vergleichbare Synapse, nach 30-sekündiger Photostimulation. Gedockte Vesikel sind verschwunden, stattdessen finden sich große, leere Vesikel (schwarzer Pfeil), welche die Zelle durch Einschnürung gebildet hat.

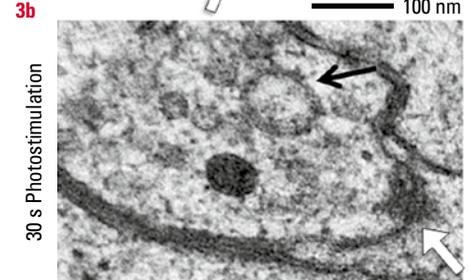
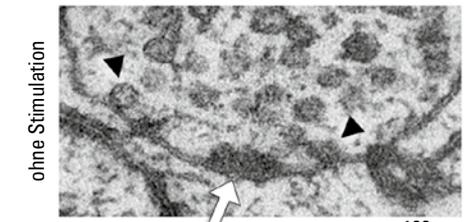
len spezifisch zu beleuchten und andere auszusparen, so dass nur das gewünschte Neuron mit Licht aktiviert wird (Stirman et al. 2011). So haben wir Nervenzellen gefunden, die auf mechanische Reize reagieren – etwa wenn das Tier auf ein Hindernis stößt – und eine Fluchtreaktion auslösen (Husson et al. 2012). Andere Nervenzellen kontrollieren die Tierbewegung, etwa die koordinierte, schlängelnde Fortbewegung auf einem festen Untergrund. Aber wir fanden auch Neuronen, die der Wurm braucht, um zu stoppen oder eine Rückwärtsbewegung einzuleiten. Zudem haben wir Nervenzellen untersucht, die Bewegungen eher auf einer übergeordneten Ebene regulieren, also ein Verhalten, das man als Navigation bezeichnen könnte, beispielsweise, um gezielt eine Futterquelle zu finden (und nicht rein zufällig).

Schnappschüsse von der Synapse

Die Weiterleitung der Reize zwischen zwei Nervenzellen erfolgt an Synapsen, und zwar zumeist über die Transmission chemischer Signale, sogenannte Neurotransmitter. Diese werden, in kleine Organellen (Vesikel) verpackt, von elektrisch angeregten Neuronen an die synaptische Membran abgegeben. Von der signalempfangenden Nervenzelle werden sie über Rezeptoren wahrgenommen, was häufig dazu führt, dass Ionen in die Zelle einströmen. Dadurch verändert sich das Membranpotenzial, wodurch sich wieder ein elektrischer Reiz ausbreitet.

Uns hat nun interessiert, was passiert, wenn Nervenzellen sehr stark oder dauerhaft gereizt werden. Das kann Bestandteil ihrer normalen Funktion sein, aber auch in pathologischen Situationen ausgelöst werden, etwa bei einem epileptischen Anfall (Liewald et al. 2008). Es kommt dann zu einer sehr starken und anhaltenden Ausschüttung von Neurotransmittern. Da nur eine begrenzte Anzahl von Neurotransmitter-Vesikeln vorhanden ist, müssen diese neu hergestellt beziehungsweise recycelt werden. Die Zelle muss dann Teile der Membran sowie Proteine, die das Neurotransmitter-Vesikel bilden, wieder in das

3a Synaptische Strukturen



weißer Pfeil präsynaptische Zytomatrix, schwarze Dreiecke gedockte synaptische Vesikel, weißer Pfeil endozytotisches Vesikel

Zell-Innere aufnehmen. Es ist uns, zusammen mit der Gruppe von Stefan Eimer (ENI, Göttingen, zurzeit Universität Freiburg) gelungen, diesen als Endozytose bezeichneten Vorgang, der sich im Nanometer- und im Millisekundenbereich abspielt, zu beobachten. Dazu stimulierten wir optogenetisch eine starke Neurotransmission und fixierten die Synapsen dann sehr schnell durch Hochdruckgefrieren. Nach weiteren Arbeitsschritten kann man dann die Nanometer-Strukturen an der Synapse im Elektronenmikroskop sichtbar machen (Kittlmann et al. 2013).

Auf diese Weise erhielten wir eine Momentaufnahme der Vorgänge an der Synapse. Wir konnten in zeitlicher Abfolge beobachten, wie synaptische Vesikel entstehen und (durch Fusion) an der Zellmembran wieder verschwinden, und wie sich endozytotische Einstülpungen der Zellmembran bilden und wieder verschwinden. So war es möglich, die Bedeutung einzelner Proteine für diese Vorgänge in genetischen Mutanten zu analysieren und zu verstehen, wie Nervenzellen auf eine extreme Stimulation reagieren, dabei aber trotzdem funktional

Literatur der Gottschalk-Gruppe

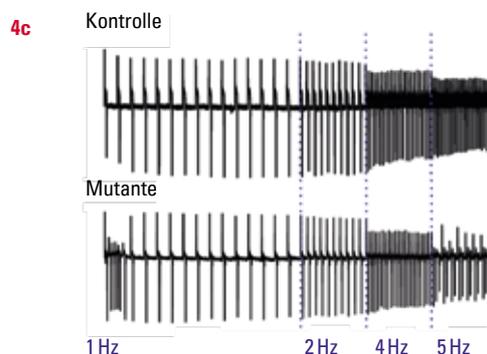
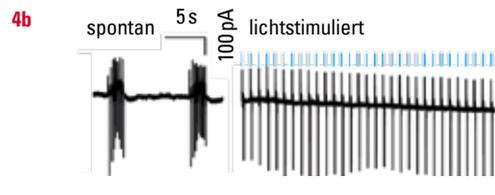
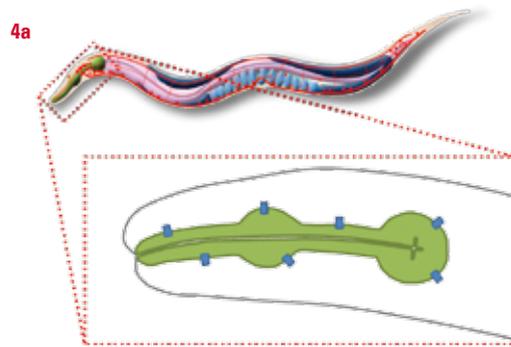
- 1 AzamiHashemi et al. (2014), Synthetic retinal analogues modify the spectral and kinetic characteristics of microbial rhodopsin optogenetic tools Nat Commun 5: 5810.
- 2 Gao, S. et al. (2015), Optogenetic manipulation of cGMP in cells and animals by the tightly light-regulated guanylyl-cyclase opsin Cycl1Op, Nat Commun 6: 8046.
- 3 Husson, S. J. et al. (2012), Optogenetic Analysis of a Nociceptor Neuron and Network Reveals Ion Channels Acting Downstream of Primary Sensors, Curr Biol 22: 743-752.
- 4 Kittlmann, M. et al. (2013), In vivo synaptic recovery following optogenetic hyperstimulation, PNAS U S A 110: E3007-3016.

bleiben, beziehungsweise sich nach einem epileptischen Anfall erholen können.

Das Fressorgan als Modell für (Herz-)Muskelarrhythmien

Optogenetische Methoden eignen sich auch dazu, Muskelzellen zu stimulieren. Wir haben dies ausgenutzt, um ein Modell für bestimmte Formen genetischer Herzarrhythmien zu erzeugen. Beim Timothy-Syndrom sind die Aktionspotenziale des Herzens verlängert und somit auch die Herzschlagdauer, was bei hoher Beanspruchung wie körperlicher Belastung zu Herzarrhythmien führt und im schlimmsten Fall mit einem Herzstillstand endet. Ursache dafür sind Mutationen, die zur Überaktivität eines bestimmten Ionenkanals führen. Es handelt sich um den spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanal vom L-Typ (Cav1.2), der die Länge des kardialen Aktionspotenzials regelt.

Als Modell verwendeten wir das Fressorgan des Fadenwurms, den Pharynx. Es besteht aus einer rhythmisch aktiven Muskelgruppe, die ähnlich wie das Herz von Säugetieren funktioniert. Wir konnten den Pharynx von *C. elegans* mithilfe von Channelrhodopsin in eine regelmäßig »schlagende« Pumpe verwandeln und Mutationen im analogen Ca^{2+} -Kanal von *C. elegans* (EGL-19) einbringen. Tatsächlich erzeugen Mutationen, die dem Timothy-Syndrom entsprechen, im Pharynx von *C. elegans* eine verlängerte Kontraktionsdauer, und bei erhöhten



Der Pharynx von »C. elegans«, eine rhythmische Muskelpumpe, dient als Modell für Herzarrhythmien

4a »C. elegans« (schematisch), mit dem Pharynx im Kopf des Tieres, einer Muskelpumpe, die zum Fressen von Bakterien dient.

4b Elektrische Aufzeichnung spontaner Pumpaktivität, im Vergleich zu lichtstimulierter (über Kanalrhodopsin; blaue Fässchen in A) Pumpaktivität (blaue Striche markieren die Lichtpulse).

4c Die Kontrolle zeigt die Reaktion des gesunden Wurms. Unten ein »kranker« Wurm mit defektem Kalzium-Kanal, der bei hohen Frequenzen unregelmäßig pumpt.

5 Liewald, J. F. et al. (2008), Optogenetic analysis of synaptic function, *Nat Methods* 5: 895-902.

6 Nagel, G. et al. (2005), Light activation of channelrhodopsin-2 in excitable cells of *Caenorhabditis elegans* triggers rapid behavioral responses, *Curr Biol* 15: 2279-2284.

7 Schueler, C. et al. (2015), Arrhythmogenic effects of mutated L-type Ca^{2+} -channels on an optogenetically paced muscular pump in *Caenorhabditis elegans*, *Sci Rep* 5:14427.

8 Stirman, J. N. et al. (2011), Real-time multimodal optical control of neurons and muscles in freely behaving *Caenorhabditis elegans*, *Nat Methods* 8: 153-158.

9 Wabnig, S. et al. (2015), High-Throughput All-Optical Analysis of Synaptic Transmission and Synaptic Vesicle Recycling in *Caenorhabditis elegans*, *PLoS One* 10: e0135584.

10 Zhang, F. et al. (2007), Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry, *Nature* 446: 633-639.

Schlagfrequenzen kam es zu arrhythmischem Verhalten. Der in *egl-19* mutierte Pharynx pumpt dann zum Beispiel nur mit 2 Hertz, obwohl eine Pumprate von 4 Hertz vorgegeben wird, was der Wildtyp problemlos leisten kann, und teils war ein chaotisches Hin- und Herspringen zwischen ganz unterschiedlichen Pumpraten zu beobachten.

Besonders interessant ist hierbei, dass wir auch potenzielle Pharmaka in diesem Modell testen können: Eine Substanz, die Präparaten zur Behandlung des Timothy-Syndroms ähnelt, indem sie die Funktion des Cav1.2-Kanals herabreguliert, konnte auch im mutierten Pharynx von *C. elegans* eine Verbesserung der Arrhythmien bewirken. Somit könnten in *C. elegans* neue Substanzen identifiziert werden, die maßgeschneidert auf die Effekte bestimmter Mutationen in Cav1.2 wirken, womöglich sogar in patientenspezifischer Weise (Schueler et al. 2015).

Die Optogenetik hat ein enormes Potenzial für zahlreiche Anwendungen in der Grundlagenforschung, insbesondere in kleinen Modellorganismen wie dem Fadenwurm. Inzwischen lassen sich aber auch Anwendungen in der medizinischen Forschung und, bei aller Vorsicht, vielleicht sogar in der Therapie erkennen. ●



Der Autor

Prof. Dr. Alexander Gottschalk, 46, kam Ende 2003 als Juniorprofessor für Biochemie nach Frankfurt. 2010 wurde er als Heisenbergprofessor für Molekulare Zellbiologie und Neurobiochemie berufen. Seit 2015 hat er eine ordentliche Professur inne. Er lehrt im Studiengang Biochemie die Fächer Neurobiologie und Zellbiologie. Seine Arbeit wird durch den Exzellenzcluster Makromolekulare Komplexe (CEF-MC) gefördert. Die Arbeitsgruppe ist im Buchmann Institut für Molekulare Lebenswissenschaften (BMLS) lokalisiert.

a.gottschalk@em.uni-frankfurt.de