

Der lichtgesteuerte Fadenwurm

Einblicke in das Nervensystem von *C. elegans*

Der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* ist nur etwa einen Millimeter lang und wird im Labor auf kleinen Kulturplatten gezüchtet **1**. Trotz seines anatomisch relativ simplen Nervensystems – bestehend aus nur 302 Nervenzellen mit zirka 5000 chemischen Synapsen – ist das »Gehirn« des Tiers in der Lage, erstaunlich viele Funktionen zu erfüllen und zahlreiche einfache Verhaltensweisen zu regulieren. So reagiert *C. elegans* auf Gerüche, Geschmack, mechanische Reize sowie die chemische Zusammensetzung, die Temperatur und den Sauerstoffgehalt seiner Umgebung. Der durchsichtige Fadenwurm bewegt sich auf eine koordinierte und sehr elegante Weise fort (daher der Name), und die Männchen zeigen ein aktives Sexualverhalten. Selbst einfache Formen von »Suchtverhalten« sowie rudimentäre Formen von Lernen und Gedächtnis können unter geeigneten Bedingungen untersucht werden. Beispielsweise reagieren die Tiere auf ein Anstoßen der Kulturplatte mit einem Rückzugsreflex, der jedoch nach häufiger Wiederholung ausbleibt. Sie lernen also, die Stöße zu ignorieren, weil sie keine Gefahr darstellen. Interessanterweise kann dieses Verhalten auch trainiert werden, so dass die Tiere selbst nach 24 Stunden noch weniger häufig auf den Stimulus reagieren.

Das Nervensystem von *C. elegans* ist bis ins kleinste Detail seiner Anatomie durch hoch auflösende Elektronenmikroskopie aufgeklärt und kartiert, und die 302 Zellen finden sich mit exakt den gleichen Verschaltungen in jedem Individuum **2**. Somit hegen einige Forscher den Traum, dass man mit diesem Wissen über die Struktur des »Schaltkreises« das gesamte Nervensystem von *C. elegans* im Computer simulieren könnte, um dessen Funktionieren genau zu verstehen. Jedoch stellte sich heraus, dass dies ohne Informationen über die Funktion der einzelnen Zellen nicht möglich ist. Nun ist die isolierte Betrachtung von Nervenzellen nicht ohne weiteres machbar, da sie sich untereinander in spezifischer Weise zu kleinen Schaltkreisen »verschal-

ten«. Selbst in einfachen Nervensystemen sind einzelne »Sub-Schaltkreise« meist zu größeren Organisationseinheiten zusammengeslossen, die dann entsprechend kompliziertere Vorgänge kontrollieren können und zum Beispiel ein bestimmtes Verhalten des Versuchstieres auslösen. Daher ist es von großem Interesse zu verstehen, wie einzelne Nervenzellen oder Gruppen von Nervenzellen innerhalb eines neuronalen Netzwerks funktionieren, um durch ihre Aktivität zum Auslösen eines bestimmten Verhaltens (oder sonstigen neuronalen »Outputs«) beizutragen.

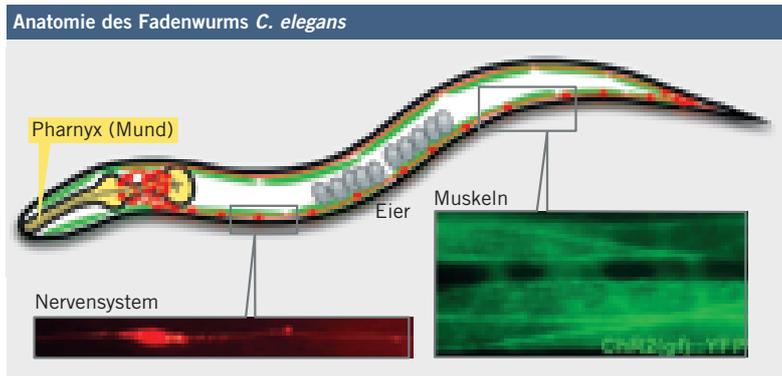
Kleine Unterschaltkreise hat man seitdem durch eine Kombination von Anatomie und funktionellen Experimenten aufklären können, indem man die einzelnen Zellen durch Laserbeschuss in einem frühen Entwicklungsstadium zerstört. Dies erlaubt vor allem die Aufklärung von Schaltkreisen, die ein leicht zu beobachtendes Verhalten steuern, wie etwa den Rückzugsreflex. So fand man, dass bei Berührung der »Nase« des Wurms Zellen angesprochen werden, die auf mechanische Reize reagieren. Diese aktivieren stromab Kommando-Neuronen, die wiederum die Motorneuronen dazu anregen, eine Rückwärtsbewegung auszuführen.

1 Lichtmikroskopische Aufnahme von *C. elegans*, zirka 100-fach vergrößert. Das durchsichtige, ausgewachsene Tier ist im Original nur etwa einen Millimeter lang. Der Kopf mit dem Fressorgan (»Pharynx«) ist oben links zu sehen, in der Körpermitte kann man etwa 15 Eier erkennen, der Rest des Körpers ist vom Darm ausgefüllt.

Umgekehrt führt Berührung am Schwanz zu einer beschleunigten Vorwärtsbewegung.

Eine genetische Anleihe bei der Grünalge

Um die volle Information über die Funktion einer beliebigen Nervenzelle zu haben, muss man sie gezielt stimulieren können. Dies ist relativ einfach zu erreichen, wenn es sich um ein sensorisches Neuron handelt, da man dann den natürlichen Stimulus (chemische Substanz, Berührung, Temperaturänderung) nutzen kann. Andere Zellen kann man elektrisch stimulieren, jedoch muß man dazu eine Glaselektrode im mikroskopischen Maßstab in die



2 Unter der Haut von *C. elegans* befinden sich Muskelzellen (grüne Streifen), die sich entlang des ganzen Körpers erstrecken. Das Nervensystem des Tiers besteht aus kleinen Nervenzellen mit langen Fortsätzen (rot, Zellkörper sind als Ovale dargestellt). Diese Fortsätze erstrecken sich von Kopf bis Schwanz, die meisten Nervenzellen befinden sich im Kopfbereich rund um das Fressorgan (»Pharynx«), im Schwanz und entlang der ventralen (»Bauch-«) Seite. Dort werden auch die meisten Körpermuskeln »innerviert« und so von den Nervenzellen in koordinierter Weise zu Kontraktionen und Entspannungen angeregt. Dadurch entsteht die elegante wellenförmige Bewegung des Körpers. Eingesetzt sind originale Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Neuronen (rot) und Muskelzellen (grün) gezeigt, die ChR2 in ihrer Zellmembran enthalten.

Nähe der entsprechenden Zelle bringen oder diese damit direkt kontaktieren. Dies ist aber in dem nur einen Millimeter langen *C. elegans* (und im Übrigen auch in größeren Versuchstieren) ungemein schwierig, insbesondere, da man die Tiere dazu ruhig stellen und die Zelle »operativ« präparieren muß. In dem kleinen Fadenwurm ist dies mit normalem Verhalten nicht vereinbar. Wie könnte man also auf andere Art einen Stimulus an eine beliebige Nervenzelle übertragen? Da die Tiere vollkommen transparent sind, ist eine Möglichkeit die Anregung mit Licht. Dies mag auf den ersten Blick sehr ungewöhnlich

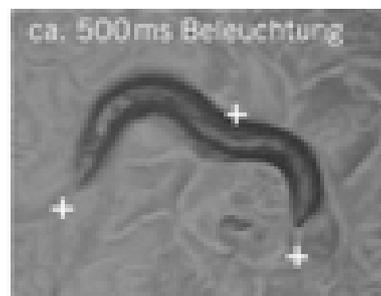
durchlässige Membranen der Zelle eingebaut und öffnet, wenn es mit blauem Licht bestrahlt wird, eine intrinsische Ionenpore. Gelangt ChR2 in die Außenmembran von Zellen, so lässt es nach Lichtabsorption positiv geladene Ionen in die Zelle einströmen, wodurch diese sie für die Reizleitung aktiviert (»depolarisiert«) wird (siehe »Reizleitung zwischen Nervenzellen«, S. 55). ChR2 funktioniert nach einem ähnlichen Prinzip wie die Lichtsensor-Proteine in unserer Retina: Es bindet ein kleines Molekül, Retinal, das bei der Absorption von Licht seine Struktur verändert. Im Falle von ChR2 überträgt sich diese Än-

dem legten sie manchmal Eier ab, da auch die für die Eiablage notwendigen Muskeln das ChR2-Protein enthielten. Wichtig ist hierbei zu erwähnen, daß *C. elegans* normalerweise keine direkte Reaktion auf Licht zeigt, obwohl die Tiere intensives blaues (und vor allem ultraviolettes) Licht vermeiden. Sie beginnen sich dann schneller zu bewegen, um aus dem Lichtkegel herauszukommen. Kontraktionen werden durch Licht unter normalen Bedingungen jedoch nie ausgelöst.

Zudem konnten wir durch eine elegante Kontrolle zeigen, dass die Reaktionen streng auf dem Vorhandensein von funktionsfähigem ChR2 in den Zellen basiert: Ohne das Retinal-Molekül kann sich der Ionenkanal nicht öffnen, und dieses Molekül kann *C. elegans* selbst nicht in ausreichendem Maße erzeugen, so dass wir es mit der Nahrung zugeben müssen. In Tieren, die zwar das ChR2-Protein enthalten, jedoch ohne Retinal kultiviert wurden, traten überhaupt keine lichtinduzierten Kontraktionen auf. Die lichtinduzierten elektrischen Ströme, die durch das Protein fließen, konnten wir auch direkt durch elektrophysiologische Methoden nachweisen, und auch diese traten nur auf, wenn Retinal im Wachstumsmedium vorhanden war.

Als nächstes brachten wir ChR2 in Nervenzellen ein, zuerst in mechanosensorische, also auf mechanische Reize reagierende Zellen. Hier konnten wir tatsächlich durch Licht schnelle Fluchtreaktionen auslösen, die sonst durch eine Berührung oder Erschütterung ausgelöst werden. Wiederum traten diese nur auf, wenn die Tiere in Anwesenheit von Retinal kultiviert wurden und die Mechanorezeptorzellen ChR2 enthielten. Diese Arbeiten haben wir bereits 2005 veröffentlicht (Nagel et al. 2005). Weitere erfolgreiche Anwendungen waren die Stimulation erregender beziehungsweise hemmender Motoneuronen, die entweder Kontraktionen oder vollständige Entspannung der Muskeln auslösten. Auf diese Weise können wir nicht nur untersuchen, welche Nervenzellengruppen ein bestimmtes Verhalten auslösen, sondern auch die Funktionalität der Synapsen in genetischen Mutanten charakterisieren, in denen die Kommunikation zwischen den Nervenzellen gestört ist. Das Ausmaß

3 Ein genetisch verändertes Tier, das ChR2 in den Körpermuskeln enthält, vor der Beleuchtung mit blauem Licht (links), und eine halbe Sekunde nach dem Anschalten (rechts). Der Körper ist kontrahiert, wie sich anhand der Fixpunkte (Kreuze) erkennen lässt.



erscheinen. Gelingt es aber, die normalerweise nicht lichtempfindlichen Zellen lichtsensitiv zu machen, so lassen sie sich durch Licht, ohne mechanischen Einfluss und »Operation« anregen.

Die Idee dazu ging von Arbeiten unserer Kollegen am Frankfurter Max-Planck-Institut für Biophysik, Prof. Dr. Ernst Bamberg und Prof. Dr. Georg Nagel (inzwischen Universität Würzburg), aus. Sie experimentierten mit einem lichtsensitiven Ionenkanal-Protein aus einer Grünalge (Nagel et al. 2003). Dieser Sensor ermöglicht es der Alge, sich im Wasser optimal nach dem für die Photosynthese benötigten Sonnenlicht auszurichten. Das Protein, genannt Channelrhodopsin-2 (ChR2), wird in normalerweise un-

derung dann so auf das Protein, dass sie eine Öffnung des ChR2-Kanals in der Zellmembran bewirkt.

Blaues Licht steuert Muskel- und Nervenzellen

Für unsere Experimente zur gezielten Anregung einzelner Zellen bauten wir das Gen für ChR2 in den Fadenwurm *C. elegans* ein. Damit die Synthese des kodierten ChR2-Proteins nur in bestimmten Zellen auftrat, stellten wir dem Gen regulatorische DNA-Sequenzen voran. Zunächst brachten wir das Gen in Muskelzellen des Wurms ein. Tatsächlich zogen sich die Muskelzellen nach Beleuchtung mit blauem Licht zusammen, und die Tiere schrumpften sofort entlang ihrer gesamten Körperlänge ein **3**. Zu-

Literatur

Bi, A., J. Cui, Y. P. Ma, E. Olshevskaya, M. Pu, A. M. Dishoor and Z. H. Pan (2006). »Ectopic expression of a microbial-type rhodopsin restores visual responses in mice with photoreceptor degeneration.« *Neuron* 50 (1): S. 23–33.

Boyden, E. S., F. Zhang, E. Bamberg, G. Nagel and K. Deisseroth (2005). »Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity.« *Nat Neurosci* 8(9): S. 1263–8.

Miller, G. (2006). »Optogenetics. Shining new light on neural circuits.« *Science* 314 (5806): S. 1674–6.
Nagel, G., M. Brauner, J. F. Liwald, N. Adeishvili, E. Bamberg and A. Gottschalk (2005). »Light activation of

channelrhodopsin-2 in excitable cells of *Caenorhabditis elegans* triggers rapid behavioral responses.« *Curr. Biol.* 15 (24): S. 2279–84.

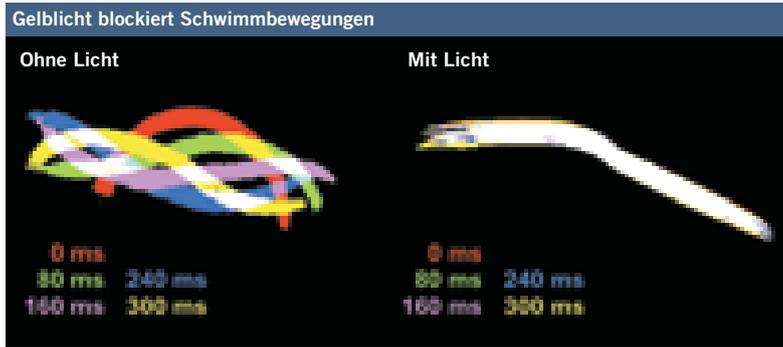
Nagel, G., T. Szellas, W. Huhn, S.

Kateriya, N. Adeishvili, P. Berthold, D. Ollig, P. Hegemann and E. Bamberg (2003). »Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel.« *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 (24): S. 13940–5.

des jeweils induzierten Kontraktions- oder Relaxationsverhaltens ist nämlich ein direktes Maß für die Menge an freigesetzten chemischen Signalstoffen aus den Neuronen.

Entspannung durch gelbes Licht

Um nun Neuronen durch Licht nicht nur aktivieren, sondern auch hemmen (inhibieren) zu können, verwendeten wir kürzlich ein weiteres in der Natur vorkommendes, Licht-aktiviertes Protein. Es bewirkt, dass negativ geladene Teilchen in die Zelle einströmen (»Hyperpolarisation«, siehe Kasten unten). Erste Versuche zeigten, dass die Aktivierung dieses optischen »Hyperpolarisators« in Muskelzellen zu sofortigem Stillstand der Tiere und zu einer Entspannung aller Muskeln führt **4**, was sich auch in einer Ausdehnung der Körperlänge widerspiegelt. Zudem konnten wir die zugrunde liegenden Photoströme über die Muskelzellmembran direkt messen. Vergleichbare Effekte ließen sich auch in den Motor-



neuronen erzielen. Interessanterweise liegt das Aktivierungsmaximum dieses »Hyperpolarisators« in einem Wellenlängenbereich, der gelbem Licht entspricht. Im Gegensatz dazu wird ChR2 mit blauem Licht maximal angeregt. Dies eröffnet die Möglichkeit, eine (Nerven-) Zelle, die beide Proteine gleichzeitig enthält, beispielsweise durch abwechselnde Beleuchtung mit blauem und gelbem Licht zu aktivieren und zu inhibieren. Tatsächlich ist uns genau dies gelungen: So konnten wir die Muskelzellen (und somit das gesamte Tier) abwechselnd

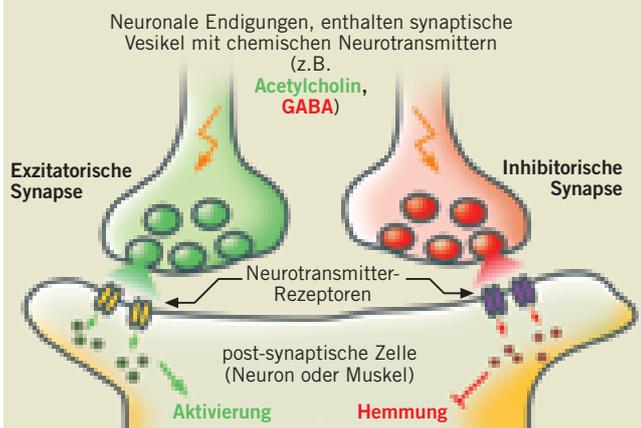
kontrahieren und entspannen lassen.

Dies erlaubt nun eine zeitlich sehr präzise Aktivierung und Inhibition von Neuronen und ermöglicht die Steuerung von Teilen (bis hinab zu einzelnen Zellen) von Nervenschaltkreisen, um deren Funktion im Detail aufzuklären. Anwendungen, die wir in nächster Zeit angehen wollen, sind die Aufklärung der Funktionen von einzelnen Nervenzelltypen im lokomotorischen System von *C. elegans*, welche die Bewegung regulieren. Dabei interessiert uns sowohl, wie

4 In Falschfarben sind je fünf aufeinander folgende Bilder der Schwimmbewegungen von *C. elegans* aus einem Videofilm übereinander gelegt. Sie wurden im Abstand von je 80 Millisekunden aufgenommen (links). Hemmt man die Muskeln oder aktivierenden Motoneuronen von *C. elegans* durch Lichteinstrahlung, hört das Tier sofort auf zu schwimmen (rechts).

Reizleitung zwischen Nervenzellen

Die Funktion eines Nervensystems basiert auf einem Geflecht von Nervenzellen, die untereinander Signale austauschen. Dabei setzt eine aktive Nervenzelle chemische Botenstoffe frei, die dann in einer stromab gelegenen Nervenzelle durch Rezeptoren wahrgenommen werden. Diese Verbindungen werden (chemische) Synapsen genannt. In der Folge strömen elektrisch positiv geladene Teilchen – Ionen – in diese zweite Nervenzelle und verändern das elektrische Potenzial über ihrer Zellmembran (Depolarisation), was wiederum eine Aktivierung dieser Zelle bedeutet. Es gibt neben dieser aktivierenden Neurotransmission auch eine inhibierende, die zu einer Inaktivierung der stromab gelegenen Zelle führt. In diesem Fall werden andere Botenstoffe und Rezeptoren verwendet, es strömen negativ geladene Ionen in die Zellen ein, und dies führt zu einer Potenzialveränderung mit umgekehrten Vorzeichen (Hyperpolarisation).



Anzeige

Gibt's nirgendwo zu kaufen. Deshalb danken wir allen Spendern.

Termine und Infos 0800 11 949 11 oder DRK.de

die Motorneuronen die wellenförmige Bewegung des Körpers kontrollieren, aber auch, wie andere übergeordnete Zellen komplizierte Bewegungsabläufe wie Richtungswechsel und Fluchtverhalten koordinieren. Eine weitere Anwendung ist die Aufklärung der Funktion von sensorischen Zellen, die das Ausmaß der Körperbiegung wahrnehmen und entsprechend »gegensteuern« können.

»Optogenetik«:

Vielleitige neurowissenschaftliche Anwendungen

Diese neuen Methoden zur Analyse der Nervenzellfunktion (bereits als »Optogenetik« bekannt) sind nicht nur für die Untersuchung des Fadenwurms interessant, sondern haben breite Bedeutung und Anwendbarkeit für die Neurowissenschaften im Allgemeinen. So wird ChR2 bereits zu Untersuchungen im Nervensystem der Maus eingesetzt (Boyden et al. 2005; Miller 2006). Deren Nervensystem ist dem menschlichen sehr viel ähnlicher als das des Wurms, wobei sich hier natürlich gewisse Schwierigkeiten auf tun, da die Maus nicht durch-

sichtig ist. Jedoch lassen sich winzige Lichtleiterfasern auch tief in das Säugerhirn einpflanzen, wo sie dann mit einer gewissen Reichweite bestimmte Nervenzellen illuminieren können. Diese Methode stellt auch eine schonende und spezifischere Alternative zur elektrischen Reizung von Nervenzellen im Säugerhirn dar. Beim Menschen wird diese bei bestimmten Formen von Schizophrenie oder Depression auch therapeutisch eingesetzt. Hier ist natürlich noch viel Entwicklungsarbeit nötig, insbesondere, da man bestimmte Nervenzellen im Gehirn künstlich, etwa durch somatische Gentherapie, erst einmal dazu bringen muß, ChR2 herzustellen. Auch erste Versuche, ChR2 als Heilungsmethode für bestimmte Formen fortschreitender Erblindung einzusetzen (zunächst im

Mausmodell), wurden im vergangenen Jahr von Zhuo-Hua Pan und Kollegen an der Wayne State University in Detroit, USA, publiziert (Bi et al. 2006). Hier wurde das Protein in Neuronen in der Retina eingebracht, die normalerweise den eigentlichen Photorezeptorzellen nachgeschaltet sind, aber deren Signale ans Gehirn weitergeben. Tatsächlich konnten in Mäusen, denen die Photorezeptoren fehlen und die dadurch vollkommen blind sind, durch ChR2 wieder Lichtsignale in der Retina ausgelöst und durch den Sehnerv in das Gehirn weitergeleitet werden. Momentan sind aber die hierfür benötigten Lichtintensitäten noch zu hoch, als dass unter normalen Tageslichtbedingungen von einer nennenswerten Lichtempfindung ausgegangen werden kann. ◆

Der Autor

Juniorprofessor Dr. Alexander Gottschalk, 37, ist seit Dezember 2003 am Institut für Biochemie. Er studierte Chemie in Frankfurt und Marburg und promovierte über Nukleinsäure-Protein-Komplexe, die an der Genexpression beteiligt sind. Seine Postdoktorandenzeit verbrachte er in San Diego, USA, mit Untersuchungen zur Wirkung von Nikotin auf das Nervensystem von *Caenorhabditis elegans*. Dies und die im Artikel beschriebenen Anwendungen zur Licht-vermittelten Steuerung von Nervenzellen sind die Forschungsschwerpunkte der Arbeitsgruppe, die er am Institut für Biochemie leitet.

Typisch männlich? Eindeutig weiblich?

Über die Wechselwirkung zwischen Wirklichkeit und Klischee –
Wie Werbesprache Stereotype fortschreibt



1 Die Werbekampagne »Women and Men Like Different Things« der Firma Seagram's stellt stereotypisch weibliche und männliche Vorlieben einander gegenüber, um so höhere Verkaufserfolge zu erzielen.

Toilette, auf dem rechten Bild ist die Klobrille hochgeklappt, auf dem linken jedoch nicht; oder zwei Tortenbilder – aus einer Torte ragt eine leicht bekleidete Stripperin, das linke Bild zeigt eine Hochzeitstorte mit Miniaturfiguren eines Brautpaares. Die Botschaft erschließt sich unmittelbar: Männer klappen die Klobrille nach oben, wenn sie die Toilette benutzen; Frauen wollen heiraten, Männer genießen ihr Junggesellendasein.

Mit der Headline »Women and Men like different things« wirbt die US-amerikanische Firma Seagram's für ihre alkoholischen Erfrischungsgetränke 1. Diesem Slogan bleibt die Firma im Laufe

der Kampagne treu – lediglich die Bildillustration variiert von Anzeige zu Anzeige. Jeweils zwei einander gegenübergestellte Bilder veranschaulichen, was Frauen und was Männer »mögen«: ein und dieselbe

Warum ist es spannend, diese altbekannten Stereotype genauer zu betrachten? Dahinter steckt das, was Gender-ForscherInnen als »Ergebnisse eines normativen Kon-