

ALEXANDER GOTTSCHALK, INSTITUT FÜR BIOCHEMIE

Optogenetik, Synapsenfunktion, neuronale Netzwerke und Verhalten im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans*

Die Arbeitsgruppe befasst sich mit molekularen Details der Reizweiterleitung an chemischen Synapsen, sowie dem Zusammenwirken vieler Neuronen in neuronalen Netzwerken, und wie dieses zur Erzeugung von Tierverhalten führt. Der verwendete Modellorganismus ist der genetisch manipulierbare Fadenwurm *Caenorhabditis elegans*. Synaptische Proteinkomplexe (Acetylcholinrezeptoren) oder Organellen (synaptische Vesikel) werden aus dem Nervensystem von *C. elegans* biochemisch isoliert und deren Bestandteile funktionell charakterisiert. Dabei werden genetische, zellbiologische, und elektrophysiologische Methoden verwendet, sowie Imaging. Die Bedeutung einzelner Nervenzellen für die Ausprägung eines Verhaltens wird mit Hilfe sogenannter optogenetischer Methoden untersucht: Durch photo-aktivierte Ionenkanäle und -pumpen werden einzelne Neurone im lebenden Tier mit Licht akut angeregt oder inhibiert, und die Auswirkung dieser Intervention auf das entsprechende Verhalten untersucht.

FUNKTION VON PROTEINEN AN CHEMISCHEN SYNAPSEN

Nervensystemfunktion basiert auf der schnellen Weiterleitung von Signalen zwischen Nervenzellen, und zwar an Synapsen. Auf der prä-synaptischen Seite enthalten Synapsen chemische Neurotransmitter, die hochreguliert freigesetzt werden. Post-synaptisch sorgen Rezeptoren für eine Umsetzung des Signals, indem sie die Transmitter binden und dann einen Ionenstrom über die Membran der Zelle erlauben, der entweder aktivierend oder inhibierend wirkt. Nikotinische Acetylcholinrezeptoren (nAChRs) sind pentamere, ligandengesteuerte Ionenkanäle.

ALEXANDER GOTTSCHALK, INSTITUTE OF BIOCHEMISTRY

Optogenetics, synaptic function, neural networks and behavior in the nematode *Caenorhabditis elegans*

Research topics of this lab are the molecular details of signal transduction at chemical synapses, and how the interaction of many neurons within neural networks generates a behavioural output in an animal. The model organism under study is the genetically amenable soil nematode *Caenorhabditis elegans*. Synaptic protein complexes (acetylcholine receptors) or organelles (synaptic vesicles) are purified biochemically right from the nervous system of *C. elegans*, and their constituents are functionally characterized. To this end, genetic, cell biological and electrophysiological methods are used, as well as imaging. The importance of particular neurons for generating and shaping a behavior is investigated using so-called optogenetic methods: By way of photo-activated ion channels and -pumps, single neurons are acutely stimulated or inhibited, in the live animal, and the effect of this intervention on a particular behavior is analyzed.

FUNCTION OF PROTEINS AT CHEMICAL SYNAPSES

Nervous system function is based on fast transmission of signals between neurons, which occurs at synapses. At the pre-synaptic side, synapses contain chemical neurotransmitters, which are released in a highly regulated fashion. Post-synaptically, receptor proteins bind the transmitters and forward the signal by facilitating ion flux across the cell membrane, thus either activating or inhibiting the neuron. Nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) are pentameric, ligand-gated ion-channels. Through a so-called "Tandem affinity purification", we isolated proteins physically associated with these receptors, and are now ana-

Abbildung 1:

Der genetische Modellorganismus *Caenorhabditis elegans*, ein Nematode (differenzieller Interferenzkontrast, mit Fluoreszenzaufnahme unterlegt). Das Tier wird ca. 1 mm lang und entwickelt sich in ca. 3 Tagen vom Ei zum adulten Hermaphroditen. Links ist der Kopf mit dem Fressorgan, dem Pharynx. In der Körpermitte sind Eier zu erkennen. Dieses Tier wurde genetisch verändert: Es exprimiert grün fluoreszierendes Protein (GFP) in Neuronen, welche den Neurotransmitter Acetylcholin enthalten.



Figure 1:

The genetic model organism *Caenorhabditis elegans*, a soil nematode (differential interference contrast, overlaid with a fluorescence image). The animal is ca. 1 mm long and develops within 3 days from fertilized egg to adult hermaphrodite. The head with the feeding organ, the pharynx, is on the left. In the midbody, eggs can be seen. This animal was genetically manipulated: It expresses a green fluorescent protein (GFP) in neurons that contain the neurotransmitter acetylcholine.

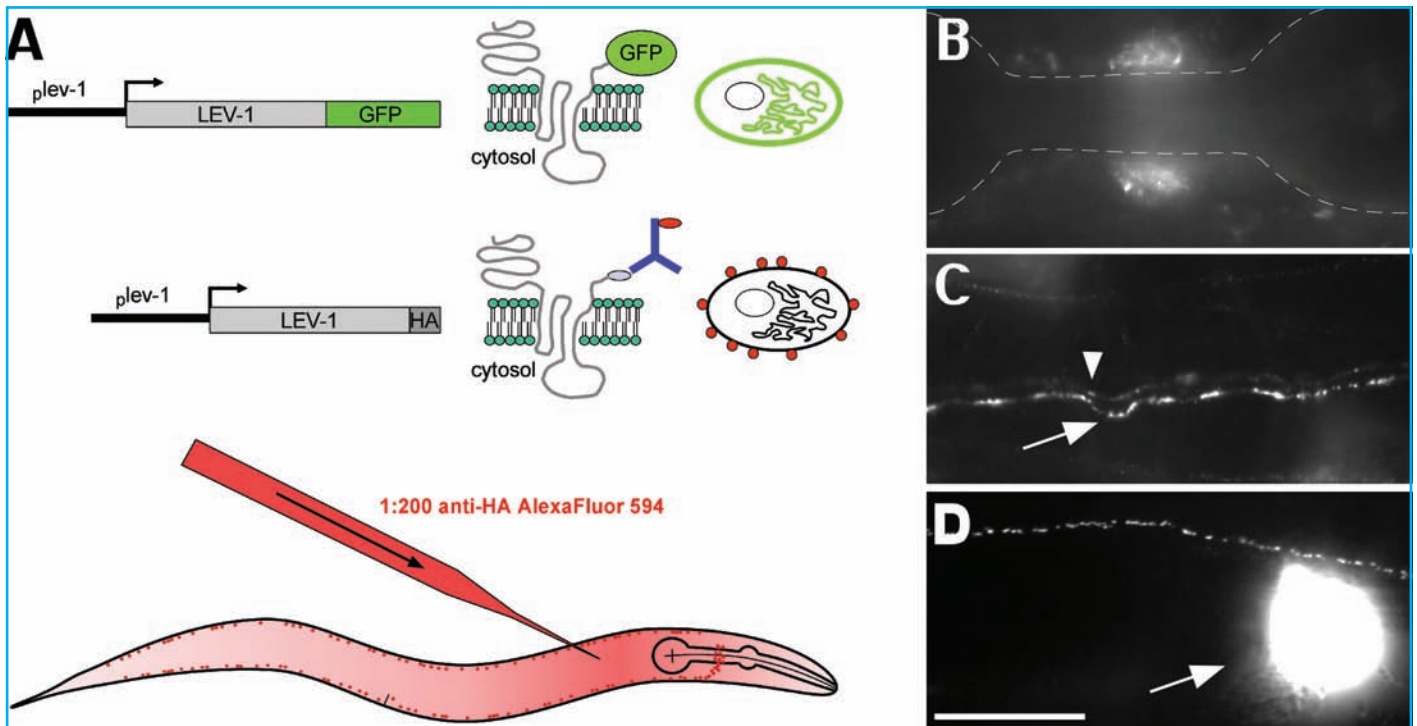


Abbildung 2:
 A) Rekombinante nikotinische Azetylcholinrezeptoren (nAChRs), die auf der Zelloberfläche - an Synapsen - exprimiert werden, können durch spezifische, fluoreszenz-markierte Antikörper im lebenden Tier sichtbar gemacht werden. Dazu müssen sie in die Körperhöhle mikro-injiziert werden. Vorteil dieser Methode gegenüber einer Fusion mit GFP ist, daß intrazellulär vorhandenes Protein nicht angefärbt wird. B-D) Verschiedene Bereiche des Nervensystems, wo nAChRs in „Clustern“ exprimiert sind, wie Nervenring (im Kopf; B), ventraler (C) und dorsaler Nervenstrang (D). Eine nierenähnliche Zelle, die überschüssige Antikörper aus der Körperhöhle entfernt hat, ist sehr hell angefärbt. Mit dieser Methode kann die Expression von nAChRs an den Synapsen quantifiziert werden, um z.B. in bestimmten genetischen Mutanten Defekte in der synaptischen Expression der Rezeptoren aufzudecken.

Figure 2:
 A) Recombinant nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs), which are expressed at synapses, i.e. on the cell surface, can be visualized by specific, fluorescently labelled antibodies, in the live animal. To this end, they need to be injected into the body cavity. The advantage of this method, when compared to a fusion with GFP, is that intracellular protein is not seen. B-D) Different regions of the nervous system, where nAChRs are expressed in synaptic clusters, such as the nerve ring (in the head; B), ventral (C) or dorsal nerve cord (D). A kidney-like cell, which took up excess antibody from the body fluid, is brightly fluorescent (arrow in D). Using this method, the expression levels of nAChRs at synapses can be quantified, e.g. to uncover defects of synaptic nAChR expression in particular mutants.

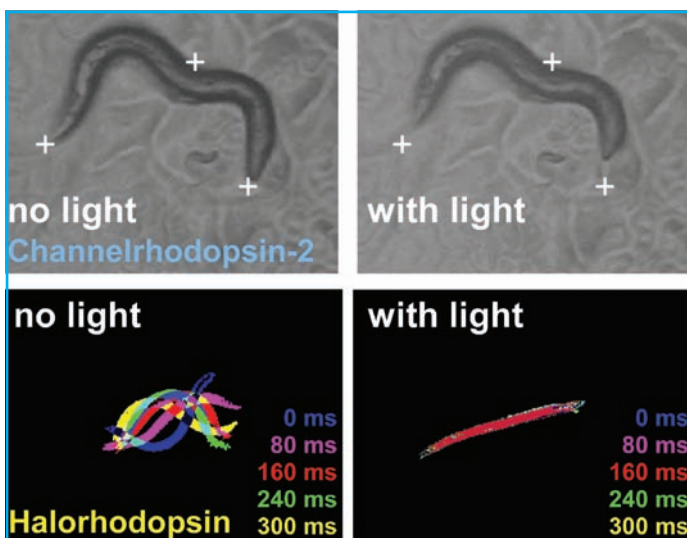


Abbildung 3:
 Verhaltenseffekte durch optogenetische Aktivierung oder Inhibition von Muskeln durch Channelrhodopsin-2 (oben) oder Halorhodopsin (unten). Die Proteine wurden in Muskeln exprimiert und jeweils durch Beleuchtung mit blauem oder gelbem Licht aktiviert. Aktivierung von Channelrhodopsin führt zu Muskelkontraktionen, die das ganze Tier sich zusammenziehen lassen. Aktivierung von Halorhodopsin in einem in Flüssigkeit schwimmenden Tier führen zu sofortigem Bewegungslosigkeit, da sich die Muskeln synchron entspannen. Analoge Ergebnisse können erreicht werden, wenn die beiden Rhodopsine in cholinergen Motorneuronen exprimiert werden.

Figure 3:
 Behavioral effects evoked by optogenetic activation or inhibition of muscles by Channelrhodopsin-2 (upper panel) or Halorhodopsin (lower panel). The proteins were expressed in muscles and activated by blue or yellow light, respectively. Activation of Channelrhodopsin causes muscle contraction, which causes shrinking of the whole body. Activation of Halorhodopsin in an animal swimming in liquid cause immediate impairment of locomotion, as the muscles relax synchronously. Analogous results can be obtained when the two rhodopsins are expressed in cholinergic motor neurons.

Durch die sogenannte Tandem-Affinitätsreinigung haben wir Proteine isoliert, die mit diesen Rezeptoren physisch interagieren und untersuchen nun deren Funktion [1]. So bilden z.B. zwei dieser Proteine, NRA-2 und NRA-4, einen Proteinkomplex in der Membran des endoplasmatischen Retikulums, der die Zusammensetzung von nAChRs aus verschiedenen Untereinheiten reguliert [5]. Desweiteren isolieren wir prä-synaptische Proteine mit Funktionen in der Neurotransmission, als Teil synaptischer Vesikel, und charakterisieren sie dann funktionell. Dazu wird unter anderem Elektrophysiologie verwendet, was in den sehr kleinen Tieren (nur ca. 1 mm lang) sehr diffizil ist [2-4].

OPTOGENETISCHE METHODEN ZUR LICHTSTEUERUNG VON SYNAPSEN, NERVENZELLEN UND TIERVERHALTEN

Um Nervensystemfunktion besser zu verstehen, und um Aktivität einzelner Neurone direkt mit einem Verhalten korrelieren zu können, ist es sehr hilfreich, wenn man Nervenzellen, im lebenden Tier, gezielt von aussen anregen oder inhibieren kann. 2003 wurde erstmals Channelrhodopsin-2 (ChR2) beschrieben, ein direkt durch blaues Licht aktivierter Kationenkanal aus der Grünalge *Chlamydomonas*. Ein zweites Protein, Halorhodopsin, eine gelblicht-getriebene Pumpe für Chloridionen, kann durch ihre Aktivität Zellen hyperpolarisieren. Wir konnten die Verwendung dieser beiden Proteine im Nervensystem von *C. elegans* etablieren, und damit Synapsen [4], Nervenzellen – und Verhalten – durch einfaches Beleuchten bidirektional steuern [2,3]. So führt z.B. in cholinergen Motorneuronen blaues Licht zur Freisetzung von Acetylcholin und damit Muskelkontraktion, gelbes Licht dagegen entspannt die Muskeln, da die Neuronen inhibiert werden. *C. elegans* ist ein optimales Modell für die Anwendung dieser optogenetischen Werkzeuge, da das Tier vollkommen transparent ist und sich somit prinzipiell jede Nervenzelle in dem kleinen Nervensystem von nur 302 Neuronen durch Licht spezifisch manipulieren läßt. Das Zusammenwirken verschiedener Neuronen in kleinen Netzwerken läßt sich somit direkt mit den ausgelösten, unterdrückten oder modifizierten Verhaltensweisen korrelieren. Auch die Funktion einzelner Synapsen, z.B. um eine genetische Mutante mit dem Wildtyp zu vergleichen, läßt sich mit Hilfe der Optogenetik analysieren, sowohl durch Elektrophysiologie, aber auch schon auf der Ebene von Verhalten [4].

lyzing their function [1]. For example, two proteins, NRA-2 and NRA-4, form a complex in the membrane of the endoplasmic reticulum, which regulates the composition of nAChRs from different subunits [5]. Furthermore, we isolate pre-synaptic proteins functioning in neurotransmission as part of synaptic vesicles, and characterize them functionally. To this end, among other approaches, we use electrophysiological methods, which are quite challenging to be used in these tiny animals (*C. elegans* is only about 1 mm long) [2-4].

OPTOGENETIC METHODS FOR PHOTO-CONTROL OF SYNAPSES, NEURONS, AND ANIMAL BEHAVIOR

To better understand nervous system function, and to directly correlate single neuron activity with behavioral output of a circuit, it would be advantageous if one could directly activate or inhibit neurons in the live animal. In 2003, Channelrhodopsin-2 (ChR2) was described, which is a directly blue-light activated cation channel from the green alga *Chlamydomonas*. A second protein, Halorhodopsin, is a yellow-light driven pump for chloride ions, which can inactivate neurons by hyperpolarising their membrane potential. We could establish the use of both proteins in the nervous system of *C. elegans*, to achieve bidirectional optical control of synapses [4], neurons, and behavior [2,3], simply by illumination. For example, in cholinergic motor neurons, blue light activation causes release of acetylcholine, and thus muscle contraction; instead, yellow light causes muscles to relax, as the neurons are inhibited. *C. elegans* is an optimal model for applications of these optogenetic tools, as the animal is transparent, and thus, in principle, any neuron in the small nervous system of just 302 cells can be specifically manipulated. The interaction of different neurons in small neural networks can thus be directly correlated with the triggered, inhibited or modified behavior. Also the function of individual synapses, e.g. to compare a genetic mutant to the wild type, can be analysed using optogenetics, by electrophysiology, but also on the behavioral level [4].

Abbildung 4:

*Optogenetische Stimulation und elektrophysiologische Analyse der Funktion cholinerg neuromuskulärer Synapsen. Channelrhodopsin wurde in cholinergen Neuronen exprimiert, das Tier wurde präpariert und photo-aktivierte exzitatorische post-synaptische Ströme wurden durch patch-clamp Messungen aus den Muskelzellen abgeleitet. 120 Photo-Stimuli (je 10 ms lang) bei 2 Hz führen zu deutlicher synaptischer Depression. Diese Methoden können zur detaillierten Analyse von Synapsenfunktion in dem genetisch zugänglichen Tiermodell *C. elegans* verwendet werden.*

Figure 4:

*Optogenetic stimulation and electrophysiological analysis of cholinergic neuromuscular junction synapses. Channelrhodopsin was expressed in cholinergic neurons, the animal was dissected and photo-evoked excitatory post-synaptic currents (photo-ePSCs) were measured by patch-clamping a muscle cell. 120 photo-stimuli (10 ms each) at 2 Hz obviously cause synaptic depression. These methods can be used for a detailed analysis of synaptic function in the genetically amenable animal model *C. elegans*.*

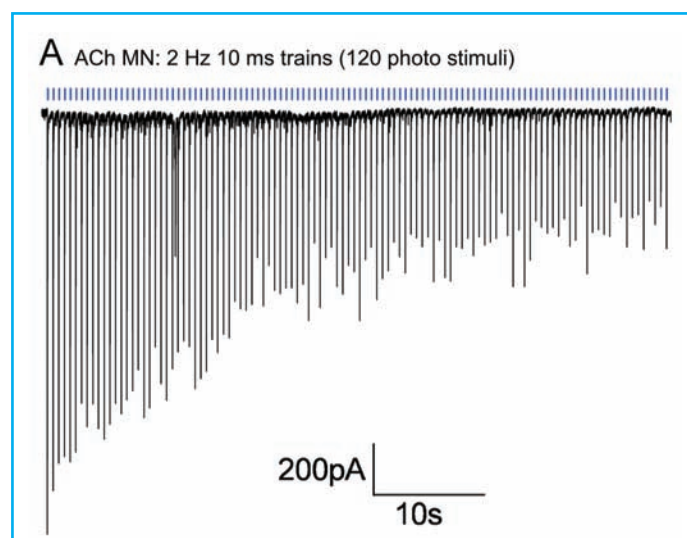


Abbildung 5:
Optogenetische Manipulation von Wurmverhalten durch Channelrhodopsin-2. Oben: Schematische Darstellung des gesamten Nervensystems von *C. elegans*. Neuronen sind durch Kugeln (Zellkörper) mit langen Fortsätzen als Linien dargestellt. Channelrhodopsin wurde in einem einzelnen Neuron, der Zelle „DVA“ exprimiert,

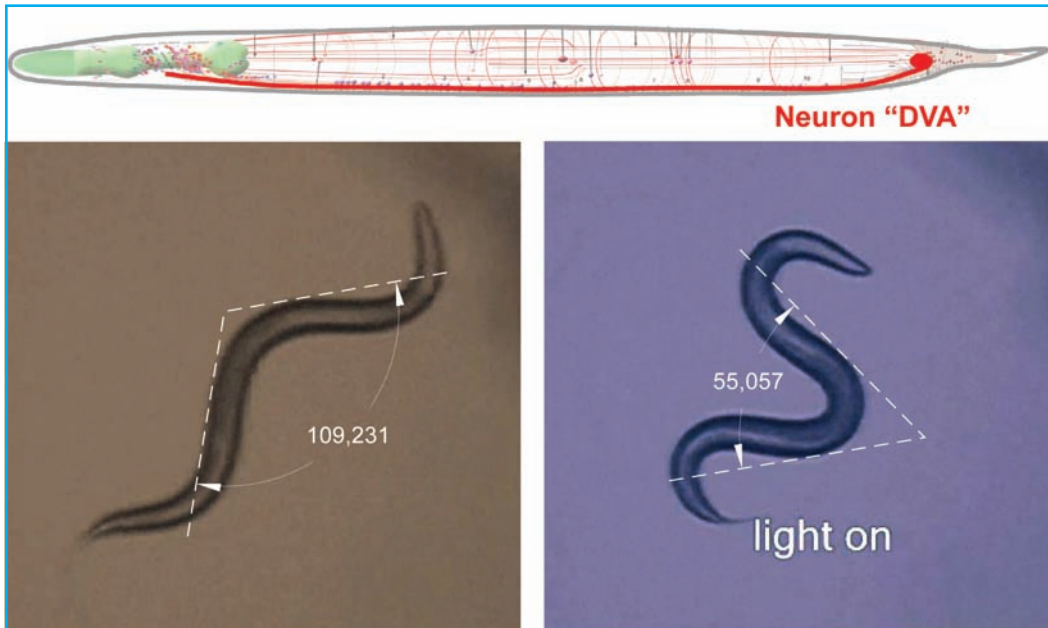


Figure 5:
Optogenetic manipulation of worm behavior by Channelrhodopsin-2. Above: Representation of the whole *C. elegans* nervous system. Neurons are symbolized by spheres (cell bodies) with long processes shown as lines. Channelrhodopsin was expressed in a single neuron, termed “DVA”, which is a sensor for body posture. Below: If

welche eine Sensorfunktion für die „Körperspannung“ von *C. elegans* hat. Unten: Wird diese Zelle photo-aktiviert (rechts), so fühlt sich das für das Tier an als wäre die Körperspannung „zu schwach“, daher wird eine stärkere Körperbiegung induziert (vgl. links, ohne Licht). Analog könnte die Funktion jedes der 302 Neuronen von *C. elegans* mit einem bestimmten Verhalten korreliert werden, sofern es gelingt, Channelrhodopsin in jeder dieser Zellen spezifisch zu exprimieren oder zu aktivieren.

this cell is photo-activated (right), the animal has the sensation of apparent “too low” body bending, and a stronger bending is thus induced (compare the situation without illumination, left). Analogously, the function of each of the 302 *C. elegans* neurons could be correlated with a particular behavior, as long as specific expression, or activation, of channelrhodopsin in each of these cells can be achieved.

LITERATUR / REFERENCES

- [1] GOTTSCHALK, A.*, Almedom, R., Schedletsky, T., Anderson, S., Yates, J. & Schafer, W.* (2005) Identification and characterization of novel nicotinic receptor-associated proteins in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J.*, **24**: 2566-2578
- [2] Nagel, G., Brauner, M., Liewald, J., Adeishvili, N., Bamberg, E. & GOTTSCHALK, A. (2005). Light-activation of Channelrhodopsin-2 in excitable cells of *Caenorhabditis elegans* triggers rapid behavioral responses. *Curr. Biol.* **15**: 2279-2284
- [3] Zhang, F., Wang, L.-P., Brauner, M., Liewald, J. F., Kay, K., Watzke, N., Wood, P. G., Bamberg, E., Nagel, G., GOTTSCHALK, A. & Deisseroth, K. (2007) Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry. *Nature* **446**: 633-39
- [4] Liewald, J.F., Brauner, M., Stephens, G., Bouhours, M., Schultheis, C., Zhen, M. & GOTTSCHALK, A (2008) Optogenetic analysis of synaptic function. *Nat. Meth.* **5**: 895-902
- [5] Almedom, R., Liewald, J.F., Hernando, G., Rayes, D., Pan, J., Hutter, H., Bouzat, C., & GOTTSCHALK, A. (2009) An ER-resident membrane protein complex regulates synaptic nicotinic acetylcholine receptor subunit composition.
- [6] Almedom, R., Liewald, J., Hernando, G., Schultheis, C., Rayes, D., Jie, P., Schedletsky, T., Hutter, H., Bouzat, C. & Gottschalk, A. (2009) An ER-resident membrane protein complex regulates nicotinic acetylcholine receptor subunit composition at the synapse. *The EMBO Journal advance online publication* 16 July 2009; doi:10.1038/emboj.2009.204

KONTAKT / CONTACT:

Jun. Prof. Dr. Alexander Gottschalk

Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie
Institut für Biochemie
Max-von-Laue-Str. 9
D-60438 Frankfurt

Tel.: ++49 (0)69 798 29261
Fax: ++49 (0)69 798 29495
e-mail: A.Gottschalk@em.uni-frankfurt.de
<http://www.biochem.uni-frankfurt.de/gottschalk/index.html>

