

Algen, Froscheier und Putzfimmel bei Fliegen

Neues Werkzeug zur Licht-gesteuerten Manipulation von Zellen und Tieren

Zu den wichtigsten Signalmolekülen in lebenden Zellen gehört cAMP, das grundlegende Prozesse steuert. Wir haben kürzlich mithilfe eines Algenproteins eine neue Methode entwickelt, cAMP durch kurze Lichtblitze in tierischen Zellen und lebenden Tieren zu erzeugen. Bei Fliegen lassen sich damit Verhaltensänderungen an- und wieder abschalten. Die besonders hohe zeitliche Auflösung dieses neuen Licht-gesteuerten „Werkzeugs“ sollte es ermöglichen, die Rolle von cAMP bei komplexen biologischen Fragestellungen besser zu verstehen.



www.pixelto.de

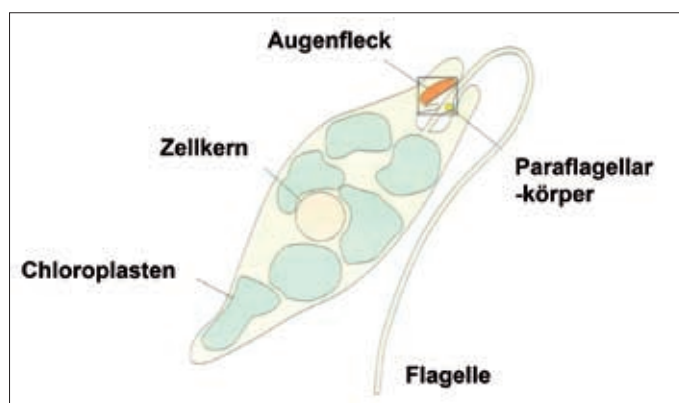


Abb. 1: Schematischer Bau des grünen Flagellaten *Euglena gracilis*



Prof. Dr. Georg Nagel,
Universität Würzburg



Prof. Dr. Peter
Hegemann, Humboldt-
Universität Berlin



Dr. Martin Schwärzel,
Universität Saarland

Zelluläre Signalketten und sekundäre Botenstoffe

Um auf Veränderungen der äußeren Bedingungen reagieren zu können, müssen in einem Organismus verschiedene Signalketten geschaltet werden. Meist wird ein Signal zunächst von einem Rezeptor erkannt und dann über so genannte sekundäre Botenstoffe weitergeleitet. Bei diesen handelt es sich um kleine, wasserlösliche Moleküle, die sich durch Diffusion in Zellen leicht ausbreiten. Ca^{2+} -Ionen und cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) sind solche Botenstoffe. cAMP überträgt beispielsweise das vom Stresshormon Adrenalin übermittelte Signal ins Zellinnere, wo es dann zur Mobilisierung von Traubenzucker kommt. Hierbei bindet Adrenalin an einen Rezeptor auf der Plasmamembran einer Leber- oder Muskelzelle, worauf in der Zelle cAMP gebildet wird. Dabei ist Adrenalin nur eines von vielen Hormonen und anderen Signalmolekülen, die die cAMP-Produktion in Gang setzen.

cAMP beeinflusst Funktionen wie Herzschlag, Sekretion, Zellwachstum, und vermutlich auch Intelligenz und Gedächtnis, ist somit also ein sehr wichtiger Botenstoff. Um die Auswirkungen von cAMP zu erforschen, wäre es ideal, wenn es sich schnell und wiederholbar in der lebenden Zelle bzw. im lebenden Tier erzeugen ließe.

Licht-abhängiger Botenstoff in einer einzelligen Alge

Bereits Einzeller weisen Signalketten auf, womit sie auf veränderte Umweltbedingungen reagieren. Viele bewegliche Bakterien und Mikroben sind zum Beispiel befähigt, mittels positiver Phototaxis photosynthetisch nutzbares Licht aktiv aufzusuchen und schädliches, intensives Licht (vor allem UV) durch negative Phototaxis oder phobische Reaktionen zu meiden. Beim grünen einzelligen Flagellaten, dem Geißeltierchen *Euglena gracilis*, war hierzu sowohl der Photorezeptor wie auch die Signalkette

lange Zeit völlig unbekannt. Es wurde vermutet, dass der Photorezeptor gegenüber dem „Augenfleck“ an der Basis der beweglichen Geißel liegt (Paraflagellarkörper, siehe Abb. 1) und dass es sich hierbei um ein Flavoprotein handeln könnte. Im Jahr 2002 wurde von einer japanischen Gruppe erstmals ein Proteinkomplex aus dem Paraflagellarkörper von *Euglena gracilis* beschrieben, der aus Flavoproteinen mit Photoaktivierter Adenylatcyclaseaktivität (PAC) bestand [1]: das Enzym erhöht Blaulicht-abhängig die cAMP-Konzentration an der Flagellenbasis, was vermutlich zur Öffnung cAMP-abhängiger Kanäle führt.

Algenprotein macht Froschoocyten Licht-sensitiv

Wir haben nun in Zusammenarbeit mit der Gruppe in Japan Bestandteile dieses Komplexes erstmals in tierische Zellen gebracht und gezeigt, dass dort Blaulicht-abhängig cAMP gebildet wird. Dazu wurde die cDNA für eine der beiden Un-

tereinheiten des Proteinkomplexes (PAC α /PAC β) in Eizellen (Oocyten) des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* eingebracht und führte damit zur Produktion des entsprechenden Proteins. Wurden diese Eizellen mit Blaulicht belichtet (Abb. 2), so kam es zu einem Anstieg in der cAMP-Konzentration. Diesen cAMP-Anstieg konnten wir auf verschiedene Art direkt nachweisen und zeigen, dass PAC α allein eine hocheffiziente Adenylatcyclase ist, während PAC β eine ca. 100fach geringere Aktivität aufweist. Beim immunologischen Nachweis von cAMP in Oocyten wurde nach wenigen Tagen Expression von PAC α im Dunkeln bereits eine 20fach erhöhte cAMP-Konzentration nachgewiesen. Eine fünfminütige Belichtung mit Blaulicht erhöhte cAMP nochmal um den Faktor 10. Als alternative Methode zur Messung von cAMP wurden cAMP-sensitive Ionenkanäle koexprimiert, die – über Messung des elektrischen Stroms – eine schnelle und reversible Aktivierung von PAC α und PAC β durch Blaulicht nachweisen. In Zusammenarbeit mit der Gruppe von U. B. Kaupp vom Forschungszentrum Jülich wurde danach auch die funktionelle, Blaulicht-sensitive, Aktivität von PAC α in menschlichen kultivierten Zellen (HEK293) nachgewiesen. Hierbei wurde der Ca²⁺-Einstrom durch cAMP-sensitive Kationenkanäle (CNG-Kanäle) über einen Ca²⁺-Sensor verfolgt.

Algenprotein erlaubt Licht-Steuerung in Fliegen

Besonders interessant waren Versuche mit transgenen Tieren, in diesem Fall der kleinen Taufliege *Drosophila* (Abb. 3). Auch hier wurde mithilfe einer „Genfährer“ cDNA für die photoaktivierte Adenylatcyclase (PAC α) in die Fliege eingeschleust. Das entsprechende Protein wurde nun in den Nervenzellen der kleinen Fliege exprimiert und führte zu signifikanten Verhaltensänderungen: Werden Fliegen mit einem feinen Puder bestäubt, so fangen sie sofort an sich zu putzen. Diese „Putzleidenschaft“ kann bis zu 30 Minuten andauern. Auch transgene Tiere zeigen bei dieser Versuchsanordnung zunächst ein intensives Putzverhalten, wird jedoch Blaulicht eingeschaltet, so erstarrt die Fliege quasi – sie bewegt und putzt sich auch nicht mehr. Wird das Blaulicht wieder ausgeschaltet, so kehrt die Fliege innerhalb weniger Sekunden zu ihrer ursprünglichen Tätigkeit zurück. Diese Ergebnisse deuten an, dass mit dieser Methode die cAMP-Konzentration auch in Nervenzellen eines lebenden Tiers lichtabhängig verändert werden kann. Damit ist das Tor zu einem

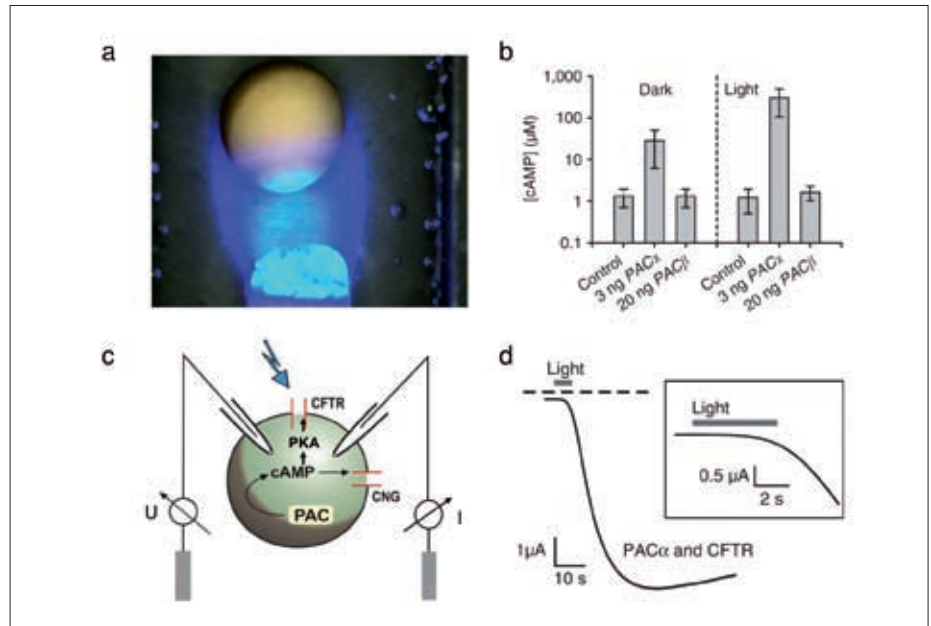


Abb. 2: a) Bild einer Oocyte des südafrikanischen Krallenfrosches (*Xenopus laevis*), die mit Blaulicht bestrahlt wird. Oocyten-Durchmesser = ca. 1 mm. b) cAMP-Konzentrationen von homogenisierten PAC α oder PAC β exprimierenden Oocyten, gemessen über cAMP-spezifische Antikörper. dark = unbelichtete Oocyte, light = [cAMP] nach 5 Minuten Blaulicht. c) Schema zum elektrischen Nachweis von Blaulicht-induziertem cAMP. PKA = cAMP-sensitive Proteinkinase, CFTR = PKA-aktivierter Anionenkanal, CNG = cAMP-sensitiver Kationenkanal. d) Blaulicht-induziertes cAMP wird über den cAMP-sensitive Anionenkanal CFTR als elektrischer Strom nachgewiesen.

neuen experimentellen Ansatz aufgestoßen. Weitere Experimente müssen nun klären, ob dabei z.B. *Drosophila*-eigene CNG-Kanäle lichtabhängig geöffnet und Aktionspotentiale ausgelöst wurden.

Vorteile der neuen Methode

Damit konnten wir demonstrieren, dass man das aus einem kleinen Einzeller stammende Enzym einsetzen kann, um die Konzentration des wichtigen Botenstoffs cAMP räumlich und zeitlich zu kontrollieren. Die Vorteile der Methode liegen auf der Hand: Das aus Euglena stammende Enzym wird von einem einzigen Gen kodiert und der für die Aktivität notwendige Chromophor FAD (Vit. B2) kommt in allen Zellen vor, muss also nicht extra zugegeben werden. Das Substrat

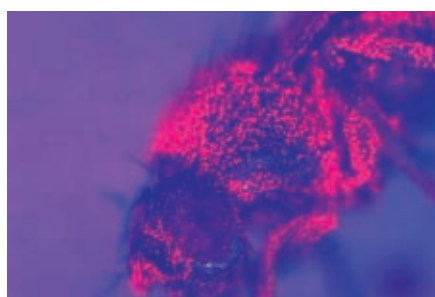


Abb 3: Bild einer mit Puder bestäubten Taufliege (*Drosophila melanogaster*) in blauem Licht. Nur transgene Fliegen, die PAC α enthalten, stellen ihr Putzen in blauem Licht ein. Wenige Sekunden nach Abschalten des Lichts nehmen sie ihr Putzverhalten wieder auf.

ATP ist ebenfalls in ausreichender Menge vorhanden und das Protein wirkt in der Zelle nicht toxisch. Damit haben vor allem Neurobiologen ein ideales Werkzeug, um Signalpfade im Tiermodell zu studieren und Fragen beispielsweise zum Lernen und zur Gedächtnisbildung, nicht nur bei *Drosophila*, aufzugreifen.

Link zum Movie: www.nature.com/nmeth/journal/v4/n1/extref/nmeth975-55.mov

Ein Video zeigt, wie Blaulicht die Bewegungen der transgenen Fliege quasi einfrieren lässt.

Referenzen

- [1] Iseki M. *et al.*: Nature 415, 1047–1051 (2002)
- [2] Schröder-Lang S. *et al.*: Nature Methods 4(1), 39–42 (2007)

Kontakt:

Prof. Dr. Georg Nagel
 Julius-von-Sachs-Institut
 Universität Würzburg
 Tel.: 0931/888-6143
 nagel@botanik.uni-wuerzburg.de

Prof. Dr. Peter Hegemann
 Experimentelle Biophysik
 Institut für Biologie
 Humboldt-Universität Berlin
 Tel.: 030/20938681
 hegema@rz.hu-berlin.de

Dr. Martin Schwärzel
 Universität Saarland
 Tel.: 0681/302-58137
 m.schwaerzel@mx.uni-saarland.de