

Konnektomik in einer marinen Larve: Klein, aber mächtig

Connectomics in a marine larva: small but mighty

Jékely, Gáspár

Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie, Tübingen

Korrespondierender Autor/in

E-Mail: gaspar.jekely@tuebingen.mpg.de

Zusammenfassung

Als Konnektome werden Schaltpläne neuronaler Netze bezeichnet, die die spezifischen Verbindungen zwischen Neuronen darstellen. Die Forschungsgruppe widmet sich dem kompletten Schaltkreis einer kleinen marinen Larve, um herauszufinden, wie neuronale Schaltkreise Verhalten vermitteln.

Summary

Connectomes are wiring diagrams of neural networks showing the specific connections between neurons. The research group Neurobiology of marine zooplankton is working on the complete wiring diagram of a small marine larva to understand how neuronal circuits mediate behaviour.

Einleitung

Die meisten der bodenorientierten marinen Wirbellosen, zum Beispiel Muscheln, Schnecken und Borstenwürmer, entwickeln sich über Larvalstadien, die als Bestandteil des Zooplanktons frei schwimmend vorkommen. Diese Larven sind für die Ausbreitung und den evolutionären Erfolg von Meerestieren sehr wichtig. Sammelt man zur richtigen Jahreszeit, wenn sich viele Tiere vermehren, mit einem Netz Planktonproben aus dem Meer, findet man eine erstaunliche Vielfalt an Larvenformen (**Abb. 1**).

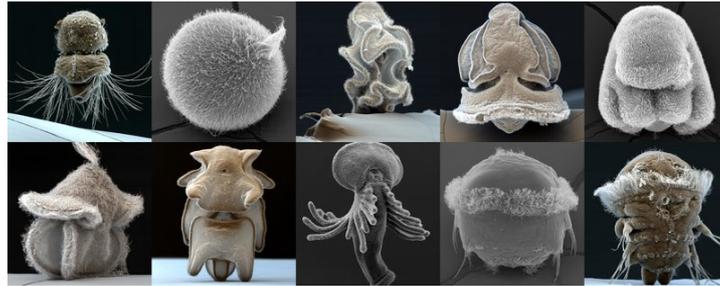


Abb. 1. Zilientragende Larven aus marinem Zooplankton. Diese rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen die frei schwimmenden Larvenstadien verschiedener mariner Wirbelloser. Von links nach rechts und oben nach unten: Brachiopod, Nesseltier, Seestern, Kiemenlochtier, Plattwurm, Nemertea, Seestern, Phoronid und zwei Annelid-Larven.
© Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie/Berger

Die Larven benutzen für ihre Schwimmbewegungen spezielle haarartige Zellfortsätze, die als Zilien bezeichnet werden. Die Zilien sind in Zilienbändern organisiert oder bedecken die gesamte Oberfläche der Larven. Die rhythmische Bewegung der Zilien sorgt für die Vorwärtsbewegung der Larven im Wasser. Viele Larven verfügen zudem über eine ausgefeilte Muskulatur, die es ihnen ermöglicht, den Körper zu biegen, Nahrung aufzunehmen oder auf dem Untergrund zu krabbeln. Anders als beispielsweise Menschen oder Insekten, die nur ihre Muskeln zur Bewegung benutzen, verfügen marine Larven also über zwei Arten von Bewegungssystemen, und die weitgehende Nutzung sowohl von Muskeln als auch von Zilien deutet darauf hin, dass diese duale Form der Fortbewegung im evolutionären Sinne uralt ist. Die Tübinger Forscher planen, durch die Untersuchung der Funktionsweise mariner zilientragender Larven mehr darüber zu erfahren, wie die Zooplankton-Wanderung erfolgt, wie neuronale Schaltkreise Verhalten erzeugen und wie sich Fortbewegungs- und Nervensysteme entwickelt haben. Zu diesem Zweck haben sie eine Art ausgewählt, die sich im Labor züchten und kultivieren lässt: den Meeresringelwurm *Platynereis dumerilii*. Weil sich *Platynereis* problemlos in Aquarien halten lässt und für genetische Manipulationen zugänglich ist, gilt diese Spezies in den letzten Jahren als idealer Modellorganismus für die Netzwerk-Neurowissenschaften auf Zellebene [1].

Konnektomik – Abbildung der Schaltkreise des Gehirns

Ein erstes Ziel der Forschungsgruppe ist die Erstellung eines kompletten Schaltplans des Nervensystems einer *Platynereis* Larve [2–4]. In Nervensystemen schließen sich Neuronen zu komplexen Netzwerken zusammen. Die Kartierung dieser Netzwerke ist wichtig, um zu verstehen, wie Neuronen miteinander kommunizieren und um auf diese Weise nachvollziehen zu können, wie das Gehirn arbeitet. Die Erstellung solcher Schaltpläne, die als Konnektome bezeichnet werden, ist inzwischen ein zentrales Anliegen der Neurowissenschaften geworden.

Zur Erstellung von Konnektomen ist die Abbildung von ultradünnen Schnitten aus Nervengewebe in einem Elektronenmikroskop erforderlich. Das Elektronenmikroskop kann Bilder mit einer ausreichend hohen Auflösung erstellen, um einzelne Synapsen mit einer Größe von einhundert Nanometern aufzulösen. Bei einer derart hohen Auflösung lassen sich dadurch jedoch nur relativ kleine Bereiche von wenigen hundert Mikrometern abbilden - das Gehirn eines Elefanten wäre mit Sicherheit zu groß für solche Analysen. Auch das Gehirn einer Maus ist mit seiner Größe von rund einem Kubikzentimeter noch immer zu groß und repräsentiert mehrere tausend Male das Volumen, das sich heute selbst mit den teuersten Mikroskopen darstellen ließe. Das heißt: Nur winzige Fragmente von solchen großen Gehirnen könnten bei synaptischer Auflösung analysiert werden.

Idealerweise sollen aber alle Neuronen eines Tieres zusammen mit allen Muskelzellen und weiteren,

verschiedenen Effektoren betrachtet werden können, die Bewegungen und andere Leistungen, beispielsweise die Drüsensekretion, hervorbringen. Aufgrund der durch die verfügbaren Technologien vorgegebenen Grenzen konnten Ganzkörper-Konnektome bisher erst von zwei Arten erstellt werden, nämlich vom Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* und von der Kaulquappenlarve der Seescheide *Ciona intestinalis* [5]. Beide Tiere sind weniger als einen Millimeter groß und bestehen nur aus wenigen hundert Nervenzellen. Die Tübinger Forscher widmen sich dem Ganzkörper-Konnektom von *Platynereis* – eines, das ähnlich groß ist, aber aus wesentlich mehr Neuronen besteht als *Caenorhabditis* oder *Ciona*. Das Nervensystem von *Platynereis* beherbergt tausende von Neuronen und steuert ein reichhaltiges Verhaltensrepertoire.

Die Augen von *Platynereis* und der Ursprung des Sehens im Meer

Ein Schaltkreis von *Platynereis*, der vollständig dargestellt werden konnte, ist der Schaltkreis der einfach gearteten Augen der Larven. Die Rekonstruktion und Funktionsweise dieses Schaltkreises hat das Verständnis der Forscher darüber erweitert, wie überhaupt die ersten Augen im Laufe der Evolution entstanden sein könnten.

Man weiß nicht, wann genau sich die ersten Sehsysteme in der Evolution entwickelt haben. Aber fossile und phylogenetische Nachweise deuten darauf hin, dass diese Entwicklung in der Meeresumwelt vor mehr als einer halben Milliarde Jahren in der Kambrium-Ära der Erdgeschichte einsetzte. Die ersten Augen waren durch eine schlechte räumliche Auflösung gekennzeichnet und erlaubten den Tieren wohl nur, helle oder dunkle Flecken in ihrem Umfeld zu erkennen [6]. Kann man dies schon als Sehen bezeichnen? Ja. Laut allgemeiner Definition repräsentiert das Sehen die Fähigkeit eines Tieres, Unterschiede in der Lichtintensität im Raum auszumachen. Beim Menschen ist der Sehsinn außerordentlich hochentwickelt; er ermöglicht uns eine sehr hohe Auflösung, Licht als Formen, Farben und Bewegung wahrzunehmen. Bei vielen anderen Tieren, wie zum Beispiel Schnecken, verschiedenen Würmern oder Bärtierchen, ist das Sehvermögen aufgrund geringerer räumlicher Auflösung und durch fehlendes Farbsehvermögen dagegen wesentlich schwächer ausgebildet. Solange aber eine räumliche Auflösung gegeben ist, wenn auch nur grobkörnig, sprechen wir von Sehsystemen. In seiner einfachsten Form sollte ein Sehsystem in der Lage sein, zwei Pixel unterscheiden zu können, die das Sichtfeld des Tieres in zwei Hälften unterteilen. Genau diese Verhältnisse wurden in der *Platynereis* Larve vorgefunden: Die *Platynereis* Augen vermitteln visuelle Phototaxis, ein Verhalten, bei dem sich die planktischen Larven entweder dem Licht zu oder vom Licht abwenden und somit entweder zur Meeresoberfläche hin schwimmen oder sich von ihr entfernen. Diese relativ einfache Aufgabe stützt sich auf die Verbindung zwischen den Augen - mit Zwei-Pixel-Auflösung - und den Muskeln im Rumpf, die die Richtungsänderung des Tiers beim Schwimmen umsetzen. Ein solcher Schaltkreis, der das einfachste visuell orientierte Verhalten steuert, könnte sich im Verlauf der Evolution durch Hinzufügen von immer mehr Zellen zu Augen mit einem höheren Auflösungsvermögen weiterentwickelt haben.

Von den Augen zu den Muskeln – die Funktionsweise des visuellen Schaltkreises der *Platynereis* Larve

Wie vermitteln die Augen der *Platynereis* Larve die Beugung der Rumpfmuskeln während der Kehrtwenden zum Licht hin oder vom Licht weg? Diese Frage konnte tatsächlich mithilfe der Konnektomik untersucht werden. Die Forscher haben einen Datensatz aus elektronenmikroskopischen Bildern erstellt, die den gesamten Körper einer Larve umfassen und über 5.000 ultradünne Schnitte enthalten (**Abb. 2**). Die Wissenschaftler haben daraufhin die neuronalen Pfade - also die Verschaltung - von den lichtaufnehmenden, Photorezeptorenzellen

der Augen durch das Gehirn verfolgt.

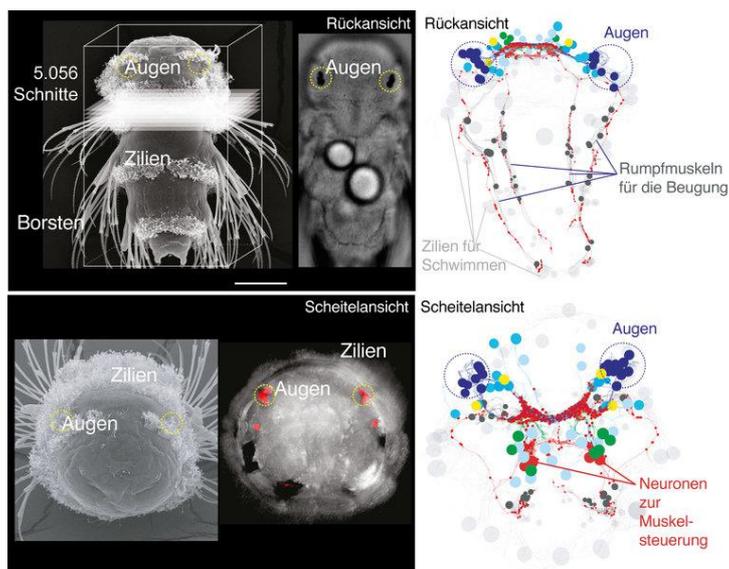


Abb. 2: Einfache Augen und ihr Schaltplan in der *Platynereis* Larve. Die Rasterelektronenmikroskop-Aufnahmen links zeigen die äußere Morphologie der Larve. Zu sehen sind die Zilien, die für die Fortbewegung der Larve sorgen, und die Borsten (Chaetae). Die Lage der Augen ist hier nachträglich gekennzeichnet - sie ist im Rasterelektronenmikroskop nicht erkennbar, da sie unter der Kutikula liegen. Die Bilder in der Mitte oben und unten sind mit Hilfe eines Lichtmikroskops entstanden. Sie zeigen die Lage der Augen, die sich durch das Vorhandensein von Pigment erkennen lassen (in Schwarz beziehungsweise Rot dargestellt). Die Bilder rechts zeigen die Ganzkörper-Elektronenmikroskop-Rekonstruktion der gesamten visuellen Verschaltung in der Larve. Die Maßstabsleiste repräsentiert 30 Mikrometer. Die transmissions-elektronenmikroskopische Rekonstruktion (rechts oben) wurde aus insgesamt 5.056 Schnitten erzeugt.
© aus [3]

Neuronen kommunizieren über spezielle Verbindungsstellen miteinander, die als Synapsen bezeichnet werden; diese wurden im Elektronenmikroskop sichtbar. Wenn sich der Leitungsdraht eines Neurons, als Axon oder Dendrit bezeichnet, über Synapsen mit den Leitungsdrähten eines anderen Neurons verbindet, deutet das darauf hin, dass diese Neuronen Teil desselben funktionellen neuronalen Netzwerks sind. Die Aufnahmen zeigen, dass mehrere Schritte über Zwischenneuronen, sogenannte Interneuronen, erforderlich sind, bis die vom Auge ausgehenden Leitungsdrähte vier bestimmte Neuronen erreichen. Diese großen Neuronen schicken ihr Axon vom Gehirn zum Rumpf des Tieres. Im Rumpf verschaltet sich jedes dieser Neuronen mit einem der vier Muskelbündel, die im Rumpf der Larve in Längsrichtung angeordnet sind; sie sind es, die die Muskelkontraktion, also die Bewegung der Larve, regeln und werden auch als Motoneuronen bezeichnet (in Abbildung 2 in der Zeichnung unten rechts als rote Punkte dargestellt).

Bei der Analyse des gesamten Schaltplans zeigte sich ein Zickzack-Pfad mehrerer Neuronen, die die Augen mit den Muskeln verbinden. Auf dem Schaltplan war beispielsweise ersichtlich, dass die Augen auf der linken und rechten Seite des Kopfes miteinander verbunden sind, und es gab sogar Hinweise auf einen Mechanismus, mit dem die beiden Seiten einfallendes Licht vergleichen können. Die von jedem Auge ausgehenden neuronalen Zickzack-Pfade verzweigten sich zudem vor dem Erreichen der Muskeln derart, dass jedes Auge ein Signal an die Muskeln sowohl auf der rechten als auch der linken Seite des Körpers abgeben kann. Das Tier muss dann – abhängig davon, ob es sich dem Licht zu oder vom Licht abwenden möchte – „entscheiden“, welche Seite stärker aktiviert werden soll. Solche Verschaltungsdetails helfen uns zu verstehen, wie das Tier das, was es

tut, am Ende tut.

Die Verschaltung des visuellen Systems der *Platynereis* Larve repräsentiert damit die erste vollständig kartierte visuelle Verschaltung eines Tieres, die aus evolutionärer Sicht eine frühe, einfache Vorstufenstruktur repräsentiert. Tiere mit höher auflösenden Augen weisen eine weitaus komplexere Verschaltung auf.

Wie fest verdrahtet sind die Leitungsdrähte im Gehirn?

Eine interessante Frage in Bezug auf die Verschaltung im Gehirn betrifft die Ähnlichkeit von Schaltplänen verschiedener Individuen. Die Frage lautet: Wie ähnlich sind sich die Nervensysteme von zwei Larven? Es könnte sein, dass jedes Tier grundsätzlich zunächst über lose miteinander verbundene Neuronenbündel verfügt, die abhängig davon, was das Tier erlebt, nachfolgend spezielle Verbindungen eingehen. Mit anderen Worten: Während der Entwicklung eines individuellen Organismus bilden sich nach dem Prinzip von Versuch und Irrtum zunächst Verschaltungen, die später, abhängig von der Erfahrung, spezielle Verbindungen herstellen. In diesem Szenario kann man nicht davon ausgehen, dass zwei Individuen bei der Lösung ein und derselben Verhaltensaufgabe zu der exakt gleichen Lösung, sprich: Verschaltung der Neuronen, gelangen. Ein alternatives Szenario wäre, dass die spezifischen Morphologien und Verschaltungen des Gehirns genetisch determiniert sind und damit von vornherein festliegen. Dies würde bedeuten, dass sich zwei Individuen sehr ähnlich sein dürften. Man vermutet, dass die Gehirne von einfacheren Wirbellosen genetisch bedingt fest verdrahtet sind, während komplexere Gehirne, zum Beispiel von Säugetieren, durch Erfahrungen geprägt werden und somit variabler sind. Allerdings wissen wir wenig über die Verschaltung auf Synapsenebene, auch als Verschaltungsstereotypie bezeichnet, zwischen Individuen derselben Art. Zur Untersuchung dieser Frage haben die Forscher den Schaltplan des Sehsystems einer zweiten *Platynereis* Larve in demselben Entwicklungsstadium untersucht. Sie fanden heraus, dass sich die beiden Individuen sowohl in Bezug auf Anzahl und Form ihrer Neuronen als auch hinsichtlich der Spezifität der Verbindungen zwischen den Neuronen bemerkenswert ähnlich waren [3]. Diese Arbeit bestätigte somit, dass das Gehirn der *Platynereis* Larven von vornherein fest verdrahtet ist und einer sehr speziellen genetischen Steuerung zu unterliegen scheint.

Die Ursprünge der Kognition im Meer

Die Augen der *Platynereis* Larven sind nur eines der vielen Sinnessysteme dieser planktischen Organismen. Die mit diesen Larven durchgeführten Verhaltensexperimente haben gezeigt, dass viele weitere Umweltfaktoren bestimmte Verhaltensreaktionen auslösen können. Dazu zählen UV-Licht, das von UV-empfindlichen Zellen außerhalb der Augen erkannt wird, Temperatur - die Larven verfügen über verschiedene Sensoren für Kälte und Wärme, Wasserbewegung und wasserbasierte Vibrationen, Wasserdruck und verschiedene Chemikalien (**Abb. 3**; [7]). Alle diese Sinne vermitteln Verhaltensreaktionen, gesteuert durch bestimmte neuronale Netze, die im Fokus aktueller und künftiger Forschungsarbeiten der Tübinger Gruppe sind.

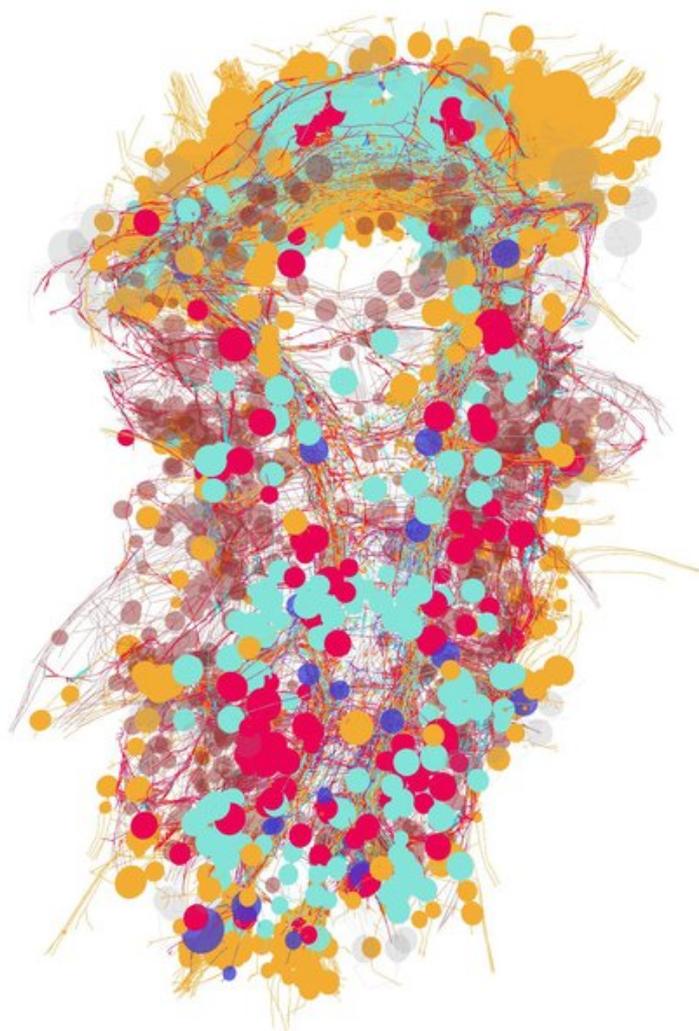


Abb. 3: Ganzkörper-Konnektom einer *Platynereis* Larve. Dargestellt sind Sinneszellen (gelb), Interneuronen (türkis), Motoneuronen (rot), Gliazellen (blau), Muskeln (violett) und zilienträgende Zellen für die Fortbewegung (grau). Rund 1.500 rekonstruierte Neuronen wurden für die Erstellung dieser Graphik verwendet.
© Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie/Jékely

Warum benötigen diese einfachen Tiere so viele Sinne? 1996 formulierte der australische Philosoph Peter Godfrey-Smith eine Umweltkomplexitätsthese als konzeptionellen Rahmen zur Erklärung des evolutionären Ursprungs der tierischen Kognition [8]. Laut dieser These „besteht die Funktion der Kognition darin, den Agierenden zu befähigen, die Umweltkomplexität zu bewältigen.“ Nach dieser Vorstellung mussten Tiere - und letztlich alle Lebensformen auf diesem Planeten - die Fähigkeit entwickeln, ihre Umwelt wahrzunehmen und ihr Verhalten an den jeweiligen Zustand ihrer Umgebung anzupassen. Kognitive Fähigkeiten, je besser sie sind, erhöhen die Überlebenschancen.

Die *Platynereis* Larven sind lebende Beispiele für die Umweltkomplexitätsthese. Bemerkenswerterweise handelt es sich bei mehr als 800 der rund 5.000 Zellen einer Larve um sensorische Neuronen für das Erkennen des Zustands einer Umweltvariablen. Die Funktion sämtlicher Sinnessysteme der Larve und deren Interaktionen untereinander aufzuklären, betrachten die Tübinger Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler als eine ihrer bedeutendsten künftigen Herausforderungen. Die Ergebnisse werden Aufschluss darüber geben, inwieweit sich die Umweltkomplexität dahingehend widerspiegelt, was im Gehirn der *Platynereis* Larve passiert. Aktuelle Forschungsergebnisse zeigen, dass marine Larven keine passiven *Drifter*, sondern

bemerkenswert komplexe, aktive Schwimmer sind, die auf viele verschiedene Parameter in ihrer Umwelt reagieren, während sie durch die Meere navigieren.

Literaturhinweise

[1] **Williams, E. A.; Jékely, G.**

Towards a systems-level understanding of development in the marine annelid *Platynereis dumerilii*

Current Opinion in Genetics and Development, 175–181 (2016)

[2] **Randel, N.; Asadulina, A.; Bezares-Calderón, L. A.; Verasztó, C.; Williams, E. A.; Conzelmann, M.; Shahidi, R.; Jékely, G.**

Neuronal connectome of a sensory-motor circuit for visual navigation

eLife 3: e02730 (2014)

[3] **Randel, N.; Shahidi, R.; Verasztó, C.; Bezares-Calderón, L. A.; Schmidt, S.; Jékely, G.**

Inter-individual stereotypy of the *Platynereis* larval visual connectome

eLife 4: e08069 (2015)

[4] **Shahidi, R.; Williams, E. A.; Conzelmann, M.; Asadulina, A.; Verasztó, C.; Jasek, S.; Bezares-Calderón, L. A.; Jékely, G.**

Serial multiplex immunogold labeling method for identifying peptidergic neurons in connectomes

eLife 4: e11147 (2015)

[5] **Ryan, K.; Lu, Z.; Meinertzhagen, I. A.**

The CNS connectome of a tadpole larva of *Ciona intestinalis* (L.) highlights sidedness in the brain of a chordate sibling

eLife 5: 16962 (2016)

[6] **Randel, N.; Jékely, G.**

Phototaxis and the origin of visual eyes

Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 371, 20150042 (2016)

[7] **Conzelmann, M.; Williams, E. A.; Tunaru, S.; Randel, N.; Shahidi, R.; Asadulina, A.; Berger, J.; Offermanns, S.; Jékely, G.**

Conserved MIP receptor-ligand pair regulates *Platynereis* larval settlement

Proceedings of the National Academy of Sciences USA 110, 8224–8229 (2013)

[8] **Godfrey-Smith, P.**

Complexity and the Function of Mind in Nature

Cambridge Studies in Philosophy and Biology (1996)