

Optogenetische studie van het nociceptor neuron ASH in *Caenorhabditis elegans*

Jan WATTEYNE

Promotor: Prof. Dr. L. Schoofs

Co-promotor: Prof. Dr. Ir. S. Husson

Proefschrift ingediend tot het
behalen van de graad van
Master of Science in de Biochemie en
Biotechnologie

Academiejaar 2012-2013

© Copyright by KU Leuven

Zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van zowel de promotor(en) als de auteur(s) is overnemen, kopiëren, gebruiken of realiseren van deze uitgave of gedeelten ervan verboden. Voor aanvragen tot of informatie i.v.m. het overnemen en/of gebruik en/of realisatie van gedeelten uit deze publicatie, wendt u tot de KU Leuven, Faculteit Wetenschappen, Geel Huis, Kasteelpark Arenberg 11 bus 2100, 3001 Leuven (Heverlee), Telefoon +32 16 32 14 01.

Voorafgaande schriftelijke toestemming van de promotor(en) is eveneens vereist voor het aanwenden van de in dit afstudeerwerk beschreven (originele) methoden, producten, schakelingen en programma's voor industrieel of commercieel nut en voor de inzending van deze publicatie ter deelname aan wetenschappelijke prijzen of wedstrijden

Dankwoord

Vooreerst wil ik professor Schoofs bedanken die me de mogelijkheid bood deze masterproef binnen de onderzoekseenheid dierenfysiologie en Neurobiologie te realiseren. Mijn interesse voor *C. elegans* neurobiologie werd reeds tijdens haar lessen gewekt. De frequente bezoeken van professor Schoofs op de werkvloer en haar bemoedigende woorden versterkten nog deze interesse.

Verder gaat mijn oprechte dank uit naar mijn co-promotor professor Husson. In een hectisch jaar maakte hij veel tijd vrij om me te begeleiden. Als *go-to man* wordt professor Husson door talrijke onderzoekers gesolliciteerd. Het was voor mij als masterstudent een privilege om een wellicht al te lange reeks vragen met zoveel expertise beantwoord te zien. Ook het kritische verbeterwerk van het manuscript van deze masterproef was een grote steun voor mij.

Bedankt Dr. Tom Janssen voor de persoonlijke assistentie tijdens het werken met de confocale microscoop.

Ik wil ook de “collega’s” *C. elegans* onderzoekers; Kevin, Liesbet, Liesbeth, Lise, Lotte, Nick, Roel en Wouter in de afdeling mijn dank betuigen. Ik kon er steeds met praktische vragen terecht en de gesprekken en grapjes voor, tijdens en na mijn experimenten zorgden ervoor dat ik steeds met een goed humeur aan de slag ging.

Bedankt aan al mijn vrienden die voor ontspannende momenten doorheen het jaar hebben gezorgd. Hierbij horen in het bijzonder mijn collega masterstudenten Elien, Els, Goele, Katleen, Thamara en Winnie, die samen met mij deze memorabele periode van mijn studententijd hebben uitgezeten.

Dank aan de talrijke koffiemachines in en rond de KU Leuven universiteitsbibliotheken.

Als laatste wil ik uiteraard ook mijn ouders, broer en familie bedanken. Als supporters langs de zijlijn hebben zij me door dik en dun gesteund tijdens dit en vorige jaren, al was het maar om iedere keer bezorgd te vragen “Hoe is het met je wormpjes?”.

Inhoudsopgave

Dankwoord.....	ii
Inhoudsopgave.....	iii
Lijst van afkortingen	vi
Deel I Inleiding en probleemstelling.....	1
1 C. elegans neurobiologie: sensorisch systeem.....	2
1.1 neurale circuits	3
1.1.1 Mechanoreceptor neuronen.....	3
1.1.2 Chemosensorische neuronen.....	4
1.1.3 Interneuronen	4
1.1.4 De polymodale ASH nociceptor.....	5
1.2 Signaaltransductie.....	7
1.2.1 Signaaltransductie in chemosensatie.....	7
1.2.2 Signaaltransductie in mechanosensatie.....	8
1.2.3 Signaaltransductie in de ASH nociceptor.....	9
1.3 Modulatie van sensorisch gedrag.....	10
2 Optogenetica	10
2.1 Optogenetica in <i>C. elegans</i>	12
2.1.1 Microbiële opsines als optogenetische proteïnen	14
2.1.2 Diversiteit van microbiële opsines	14
2.1.3 Fotostimulatie van exciteerbare cellen in <i>C. elegans</i>	15
2.1.4 Fotoinhibitie van exciteerbare cellen in <i>C. elegans</i>	18
2.1.5 Optogenetica voor biochemische processen.....	21
2.2 Kwantificering van optogenetisch-geïnduceerd gedrag	21
3 Doelstellingen.....	23
Deel II Experimenteel werk	25
4 Methoden	26
4.1 Kweek van <i>C. elegans</i>	26
4.1.1 OP50 <i>Escherichia coli</i> voedingsbron.....	26
4.1.2 NGM groeimedium (<i>Nematode Growth Medium</i>)	26
4.1.3 Wormtransfer op NGM platen.....	27
4.2 Kruisingsstrategieën.....	28

4.2.1	Generatie van mannetjes	28
4.2.2	Kruisingen opzetten	28
4.2.3	Genotypering strategie: worm PCR	28
4.2.4	Genotypering strategie: sequentieanalyse	29
4.3	Optogenetica experimenten bij <i>C. elegans</i>	30
4.3.1	<i>All-trans</i> retinal (ATR) plaatjes maken.....	30
4.3.2	Wormtransfer tot op ATR plaat	31
4.4	Opbouw van de microscoop en bijkomende hard- en software.....	32
4.4.1	Leica EL6000 externe lichtbron voor fluorescentie.....	33
4.4.2	OptoTracker.....	34
4.4.2.1	De VideoCapture module	35
4.4.2.2	De Shutter module	36
4.4.2.3	De WormTracker module	36
4.4.2.4	De WormAnalyzer module.....	39
4.5	RNA interferentie (RNAi) screen.....	41
4.5.1	<i>Feeding</i> RNAi screening	42
4.5.2	RNAi setup.....	42
4.6	Confocale microscopie	43
5	Resultaten.....	44
5.1	Optimalisatie en karakterisatie van het optogenetisch gedragsplatform.....	44
5.1.1	Lichtintensiteit van de externe EL6000 lichtbron voor fluorescentie.....	44
5.1.2	<i>Calibration Factor</i> voor het <i>tracking</i> -proces.....	45
5.2	Pilootstudie	46
5.2.1	Celspecifieke ChR2 expressie in het ASH neuronenaar.....	46
5.2.2	Optimale <i>all-trans</i> retinal (ATR) concentraties	47
5.2.3	RNAi hypergevoelige lijn met ASH-specifieke expressie van ChR2	48
5.2.4	Optogenetische karakterisatie van <i>sid-1</i> ;ASH::ChR2	48
5.3	Functionele RNAi-optogenetica screening.....	50
5.3.1	Efficiëntie van neuronale RNAi.....	50
5.3.2	Manuele RNAi-optogenetica screening	51
5.3.2	<i>Tracking</i> -experimenten	52
6	Discussie	55
6.1	Pilootstudies: Optogenetische karakterisatie van <i>sid-1</i> ;ASH::ChR2.....	56
6.2	RNAi-optogenetica screening.....	56
6.2.1	Verificatie van neuronale RNAi.....	57
6.2.2	Uitvoeren van de RNAi-optogenetica screening	58

6.2.3 Controles	58
6.2.4 Signaaltransductie bij chemosensatie	59
6.2.5 Signaaltransductie bij mechanosensatie	60
6.2.6 Modulatie van ASH sensorisch gedrag.....	62
6.2.6.1 Monoamine neurotransmitters.....	62
Serotonine	62
Dopamine	66
Octopamine	67
6.2.6.2 De tachykinine-achtige receptor	68
6.3 Conclusie	69
Samenvatting.....	70
Summary.....	71
Referenties.....	72
Deel III Addendum	a
A1. Extra figuren microscoop opstelling.....	b
A2. Gebruikte <i>C. elegans</i> stammen.....	c
A3. Gebruikte internetlinks	d
A4. Videofragmenten.....	e
A5. Risicoanalyse.....	f

Lijst van afkortingen

5-HT	serotonine, 5-hydroxytryptamine
AD	<i>aqua destillata</i>
AGE	agarose gel elektroforese
ATR	<i>all-trans</i> retinal
AMPA	2-amino-3-(3-hydroxy-5-methyl-isoxazol-4-yl)-propionzuur
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
Arch	archaerhodopsine-3
AVI	<i>audio video interleave</i>
BA	barrière filter
BR	bacteriorhodopsine (eBR: <i>enhanced</i> BR)
C1V1	ChR1/VChR1 chimeer
cAMP	cyclisch adenosinemonofosfaat
CatCH	ChR2-L132C variant
CGC	<i>Caenorhabditis Genetics Center</i>
ChETA	ChR2-E123T/A variant
ChR	channelrhodopsine
CI	<i>command</i> interneuron
CTCF	<i>corrected total cell fluorescence</i>
DA	dopamine
DAG	diacylglycerol
DCV	<i>dense core</i> vesikels
DEG/ENaC	<i>degerin/epithelial</i> Na ⁺ kanalen
(di)dNTPs	(di)deoxyribonucleotide
DNA	desoxyribonucleïnezuur
ECM	extracellulaire matrix
EDTA	ethyleendiaminetetra-azijnzuur
EtOH	ethanol

ERG	<i>ether-a-go-go</i> -gerelateerd K ⁺ kanaal
FLP	<i>flippase</i> recombinase
FTR	<i>flippase recognition target</i>
FTF	FRT::mCherry:: <i>let-858</i> 3' Terminator::FRT
GB	gigabyte
gf	<i>gain-of-function</i>
GFP	groen fluorescente proteïne
GPCR	G-proteïne gekoppelde receptoren
GTPase	guanosinetriphosfaat hydrolyserend enzyme
GUI	<i>graphical user interface</i>
HR	chlorpomp uit <i>Halobacterium halobium</i>
HV	<i>high-voltage</i>
ID	identificatie
IFT	intraflagellair transport
InsP ₃	inositol trisfosfaat
IPTG	isopropyl-β-D-thiogalactoside
KT	kamertemperatuur
L-type	<i>long lasting</i> VGCC-type
LB	<i>Luria broth</i>
LCD	<i>liquid crystal display</i>
LED	<i>light-emitting diode</i>
LP	<i>long pass</i> filter (sperfilter)
LPT	<i>line print terminal</i> (parallele printpoort)
Mac	ionenpomp uit de schimmel <i>Leptosphaeria maculans</i>
MeT	mechano-elektrisch transductie
MRN	mechanoreceptor neuron
NaAc	natriumacetaat
ND	<i>neutral density</i>
NGM	<i>nematode growth medium</i>

NpHR	chloorpomp uit <i>Natromonas pharaonis</i>
NMDA	N-methyl-D-aspartaat
OA	octopamine
ORF	<i>open reading frame</i>
<i>P</i>	promotor
PAC	fotogeeactiveerd adenylyl cyclase (bPAC, bacterieel PAC)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PKA	proteïne kinase A
PMT	<i>photomultiplier tube</i> , fotomultiplicator
PUFA	polyongesatureerde vetzuren (<i>poly unsaturated fatty acids</i>)
PTGS	post-transcriptionele gen <i>silencing</i>
PWT	<i>Parallel Worm Tracker</i>
RdRP	<i>RNA directed RNA polymerase</i>
RNA	ribonucleïne zuur (dsRNA, dubbelstrengs RNA; mRNA, <i>messenger RNA</i> ; siRNA, <i>short interfering RNA</i> ; RNAi, RNA interferentie)
RSBH ⁺	geprotoneerde retinal Schiffse base
SD	standaarddeviatie
SEM	<i>standard error of mean</i>
SFO	<i>step-function</i> opsine
SV	synaptische vesikels
TAE	Tris, Azijnzuur en EDTA
Taq Pol	<i>Thermus aquaticus</i> Polymerase
TGS	transcriptionele gen <i>silencing</i>
TM	transmembranair
tpm	toeren per minuut
TRN	<i>touch</i> receptor neuronen
TRP	<i>transient receptor potential</i> kanalen (TRPC, TRP <i>canonical</i> ; TRPV, TRP <i>vanilloid</i>)
TTL	<i>transistor-transistor logic</i>

VChR1	<i>Volvox</i> channelrhodopsine-1
VGCC	<i>voltage-gated calcium channels</i>
VGSC	<i>voltage-gated sodium channels</i>
WD40	structureel eiwitmotief van doorgaans 40 aminozuren lang dat vaak op een tryptofaan-asparaginezuur dipeptide eindigt
WT	wild-type
YFP	geel fluorescent proteïne

Deel I

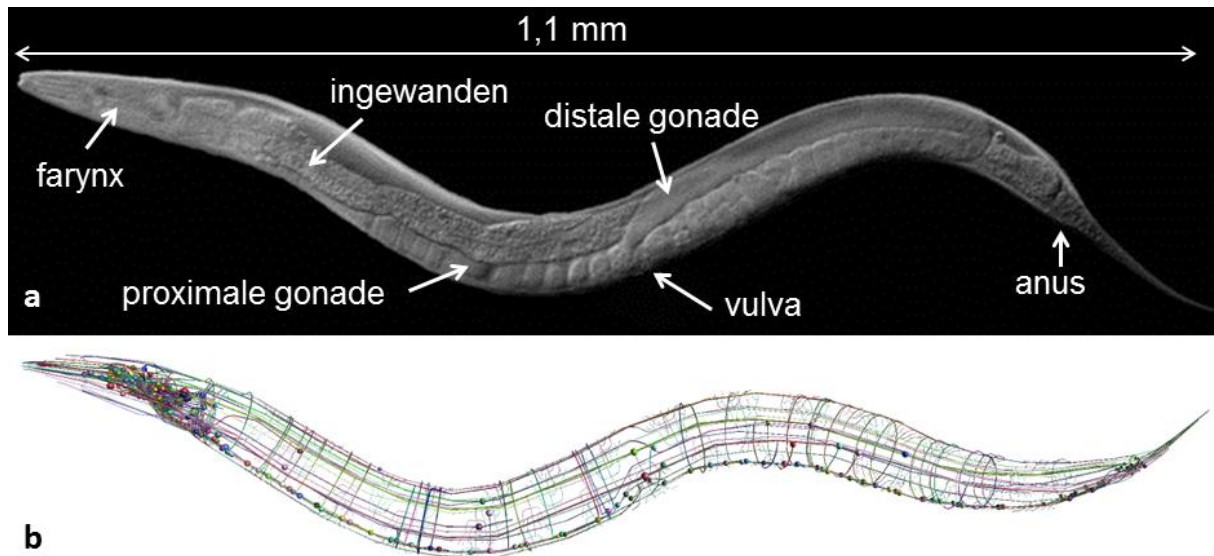
Inleiding en probleemstelling

Onderzoek naar neuronale circuits is bij hogere organismen bijzonder moeilijk aangezien er miljoenen tot miljarden zenuwcellen bijdragen tot het stellen van één bepaald gedrag. De bodemnematode *Caenorhabditis elegans* bezit daarentegen een compact zenuwstelsel van slechts 302 neuronen. De rondworm ondergaat tijdens haar ontwikkeling eenzelfde cellulaire differentiatie waardoor volgroeide hermafrodieten exact 959 somatische cellen tellen (Sulston en Horvitz, 1977). Hierbij zijn de 302 neuronen bovendien steeds op de zelfde wijze gepositioneerd en is het algemene patroon van neuronale connecties - waarvan de ongeveer 7000 synaptische verbindingen en gap-juncties met behulp van elektronenmicroscopie werden gereconstrueerd - tussen individuen behouden (White *et al.*, 1986). Dankzij dit connectoom kon men binnen het relatief eenvoudige wormgedrag de neurale netwerken onderliggend aan voortbeweging, sensorische gewaarwording en leergedrag ontrafelen. Niet alleen door het compacte en goed gekarakteriseerde zenuwstelsel is *C. elegans* een voortreffelijk modelorganisme voor neurobiologie. Het combineert ook enkele specifieke voordelen: een snelle voortplanting, kleine afmetingen (1-1.5 mm lang), relatief eenvoudige genetische manipulatie en een transparant voorkomen. Hoewel het wormgenoom met haar 100,2 megabases ongeveer een dertigtal keer kleiner is dan dat van de mens, bevat het ongeveer hetzelfde aantal genen (Hillier *et al.*, 2005). Daarbij bezit het merendeel van de circa 21000 genen duidelijke menselijke homologen en zijn bijvoorbeeld alle genfamilies betrokken in neuronale functie bij zoogdieren ook aanwezig in de worm (Bargmann, 1998). Neurobiologisch onderzoek in *C. elegans* kan hierdoor cruciale inzichten verschaffen over de werking van het menselijke brein.

1 *C. elegans* neurobiologie: sensorisch systeem

Sensorische neuronen detecteren een grote diversiteit aan externe signalen, waaronder stimuli van chemische en fysische oorsprong. Vervolgens geven signalen uitgezonden door deze sensorische zenuwcellen na integratie door de interneuronen aanleiding tot een gedagsrespons. Dit proces impliceert de aanwezigheid van complexe perceptiemechanismen waarin signaaldetectie, transductie, amplificatie en transmissie vervat zitten. Dankzij een sterk ontwikkeld sensorisch systeem kan *C. elegans* een brede waaier aan olfactorische, gustatorische en mechanische stimuli geassocieerd met voedsel, gevaar of de aanwezigheid van andere dieren, detecteren. Zo zijn 32 chemosensorische en 28 mechanosensorische neuronen in staat het complexe gedrag van de bodemnematode te moduleren (Bargmann en Mori, 1997). Dit gedrag vertoont diverse facetten in onder meer motorisch, sensorisch, voorplantings, sociaal, slaap en drug-afhankelijk gedrag tot zelfs in leren en geheugen (De Bono en Maricq, 2005). Aangezien de meeste gedragsvormen op het niveau van de voortbeweging tot uiting komen, kan deze beschouwd worden als basis van de meeste gedragsvormen (De Bono en Maricq, 2005). Een belangrijke functie van het sensorisch systeem is de detectie van potentieel schadelijke stimuli. Deze stimuli geven doorgaans aanleiding tot een nociceptieve perceptie die als onaangenaam kan worden

beschouwd (pijn). De eerste schakel in dit proces zijn de nociceptors, gespecialiseerde zenuwcellen die intense stimuli detecteren (Basbaum *et al.*, 2009). Na activatie informeren deze cellen het zenuwstelsel van de aanwezigheid van potentieel gevaarlijke prikkels waardoor een gepast protectief gedrag kan worden gecoördineerd. Zo wordt doorgaans een vermijdingsreflex ingezet die het organisme voor lichamelijke schade of zelfs dood behoedt. Pijn heeft dan ook een protectieve functie en is hierdoor voor het overlevingsproces van vitaal belang. Een overzicht van de belangrijkste anatomische structuren van *C. elegans*, alsook een driedimensionale reconstructie van het connectoom is op figuur 1 weergegeven.



Figuur 1: Anatomie van een adulte *Caenorhabditis elegans* hermafrodit. (a) *Differential interference contrast* microscopopname van een adulte hermafrodit waarbij de voornaamste anatomische structuren worden aangeduid. Afbeelding door Maria Gallegos, Kimble onderzoeksgroep. **(b)** Een driedimensionale reconstructie van het *C. elegans* connectoom. Bolletjes stellen neuronale cellichamen voor, lange lijnen geven zowel de axonen als de dendrieten weer. *OpenWorm Project*, afbeelding gegenereerd met de *neuroML* toepassing.

1.1 Neurale circuits

1.1.1 Mechanoreceptor neuronen

Mechanosensorische neuronen of mechanoreceptor neuronen (MRN) detecteren fysische stimuli die op het nematodenlichaam inwerken. Zo zijn gespecialiseerde MRNs in staat de aanwezigheid van hoge bacterieconcentraties, botsingen met andere individuen en de krachten gegenereerd door eigen beweging waar te nemen. De ongecilleerde *touch* receptor neuronen (TRN) (ALML, ALMR, AVM, PLML, PLMR, PVM) vormen een specifieke populatie waarvan elke zenuwcel lange uitlopers bezit die het wormlichaam ongeveer een halve lichaamslengte lang innervieren. Doordat de uitlopers in de dikke extracellulaire matrix (ECM) van omliggende cuticulaire cellen ingebed zijn, blijken ze uiterst geschikt om milde externe krachten alsook de door voortbeweging ontstane interne krachten te detecteren (Chalfie en Thomson, 1979). Deze zijn in principe onschadelijk (Basbaum *et al.*, 2009). Grotere mechanische krachten worden als onaangenaam ervaren, wat doorgaans een nociceptieve

perceptie veroorzaakt (Basbaum *et al.*, 2009). Essentieel hiervoor zijn twee additionele ongecilieerde neuronparen, FLP en PVD, die respectievelijk hoofd en lichaam met extensief vertakte dendritische netwerken innerveren (Chatzigeorgiou en Schafer, 2011; Way en Chalfie, 1989). Door middel van laserablaties werden recentelijk additionele neuronparen nodig voor *harsh touch* geïdentificeerd (Li *et al.*, 2011). Naargelang de plaats waar de fysische kracht op inwerkt en dus het neuron dat deze detecteert, wordt een voor- of achterwaartse ontwijkingsreflex geïnitieerd (Chalfie *et al.*, 1985).

1.1.2 Chemosensorische neuronparen

In de hoofdregio worden chemische componenten hoofdzakelijk door de binnenste labiale neuronparen en elf chemosensorische neuronparen in het amphide orgaan waargenomen. Een gelijkaardige groep zenuwcellen, de phasmiden, kan men in de staart terugvinden. Vaak worden de sensorische cilia van deze cellen doorheen een door gliacellen gevormde opening aan de omgeving blootgesteld. Anderen worden dan weer op een indirecte manier aan de omgevingsinvloed onderworpen (White *et al.*, 1986). Binnen deze neuronparen wordt een specifieke set van receptorgenen, coderend voor G-proteïne gekoppelde receptoren (GPCR), tot expressie gebracht om een specifiek scala aan feromonen, attractanten of afstotende componenten te detecteren. De verschillende responsen die hierdoor worden uitgelokt, lopen uit van chemotaxis, veranderingen in beweeglijkheid, snelle terugtrekking tot zelfs het beïnvloeden van de ontwikkeling, zoals het aanvangen en staken van het alternatieve *dauer* ontwikkelingsstadium (Bargmann, 2006).

1.1.3 Interneuronen

Op vaste bodem kruipen wormen op hun zijkant en vormen dorsoventrale spiercontracties het karakteristieke sinusoidale voortbewegingspatroon (Gray *et al.*, 2005). Tijdens conventionele voortbeweging wordt de bewegingsrichting frequent gewijzigd door middel van achterwaartse bewegingen. Deze worden niet alleen onder invloed van sensorische prikkels ingezet, maar blijken ook spontaan plaats te vinden voor het opzoeken van meer gunstige omgevingen (De Bono en Maricq, 2005). Zo wordt een terugtrekkingsreflex of *reversal* aangevangen na detectie van intense stimuli die inwerken op de kop. Soms wordt dergelijke omkering door een *omega bend* gevolgd (Croll, 1975). De naam van deze ingrijpende directionele wending werd ontleend aan de karakteristieke lichaamsvorm die *C. elegans* kortstondig aanneemt tijdens het uitvoeren van deze beweging. Een videofragment van deze achterwaartse ontwijkingsrespons na het inwerken van fysische stimuli op de kop, is in Video 1 van bijgeleverde cd te zien.

Cruciale neuronparen voor deze geïnduceerde achterwaartse beweging vinden we op het volgende niveau van het neurale netwerk (Chalfie *et al.*, 1985; Zheng *et al.*, 1999). Hier ontvangen interneuronen signalen afkomstig van stroomopwaartse sensorische zenuwcellen. De functionele connecties nodig voor de koppeling tussen mechanosensatie en

voortbeweging werden reeds onderzocht door na laserablatie van individuele neuronen het gedrag na aanraking van de neus op te volgen (Wicks en Rankin, 1995). Centraal liggen enkele *command* interneuronen (CI), waarvan AVD, AVE, en in het bijzonder AVA, een rol spelen bij het aanvangen van een achterwaartse beweging. AVB en PVC sturen dan weer de voorwaartse verplaatsing. Bijkomend toonden calcium-*imaging* studies aan dat deze interneuronen differentiële input afkomstig van verschillende sensorische cellen weten te integreren (Li *et al.*, 2011). Zoals te zien op het connectoom, sturen de AVA/D/E, *command* interneuronen signalen naar ventrale streng motorneuronen die op hun beurt de omkering aandrijven (Chalfie *et al.*, 1985). Vermits geactiveerde sensorische neuronen de achterwaartse CIs zowel direct als indirect kunnen activeren, wordt gesteld dat dit systeem een *feed-forward* stimulatorisch circuit vormt (De Bono en Maricq, 2005).

1.1.4 De polymodale ASH nociceptor

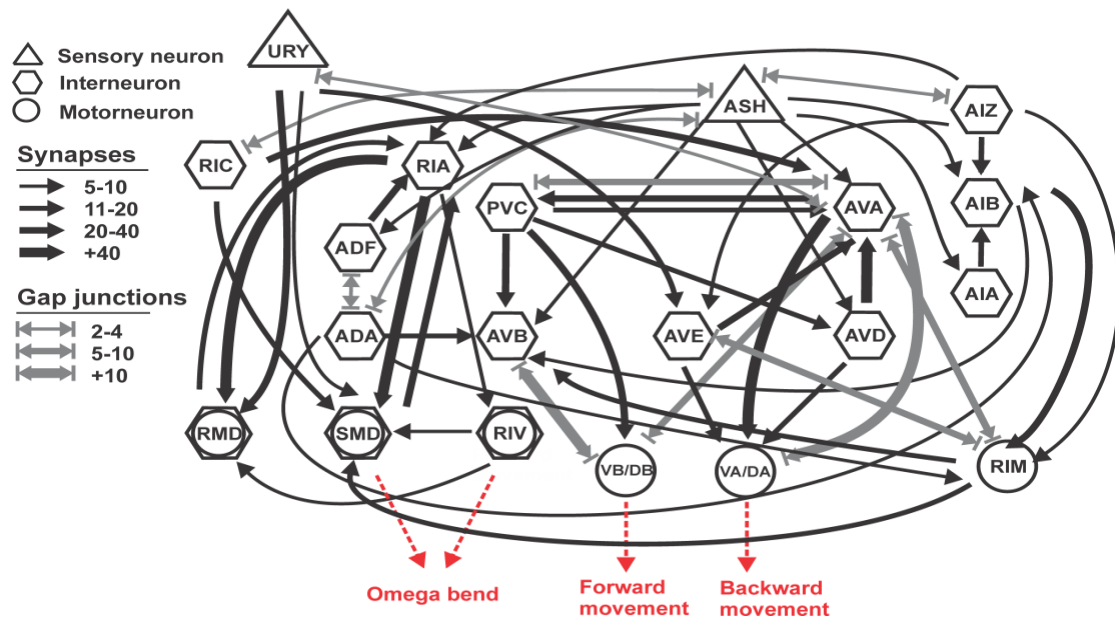
De polymodale ASH nociceptor is in staat diverse stimuli van mechanische (Kaplan en Horvitz, 1993), chemische (Troemel *et al.*, 1995; Hilliard *et al.*, 2004; Hilliard *et al.*, 2002) en osmotische (Bargmann *et al.*, 1990) oorsprong bij de neus te detecteren. De dendrieten van dit bipolaire neuronpaar (ASHL, links en ASHR, rechts) reiken doorheen een kanaal in de amphide schedecel uit naar de externe omgeving (White *et al.*, 1986). ASH werd aanvankelijk als een primair sensorisch neuron geïdentificeerd omwille van zijn karakteristieke gecilieerde morfologie en door laserablatie studies. *In vivo* ratiometrische Ca^{2+} -metingen toonden vervolgens aan dat potentieel gevaarlijke stimuli uit bovenstaande categorieën in staat zijn een korte en transiënte verhoging van Ca^{2+} -spiegels in ASH te verwekken (Hilliard *et al.*, 2005). ASH is bovendien niet alleen in staat om op concentratieverschillen van repulsieve stoffen te reageren, maar de verhoogde Ca^{2+} -concentraties te blijven behouden wanneer het neuron langdurig aan een repulsieve stof wordt blootgesteld (Hilliard *et al.*, 2005). Daarbij is er nog een bijkomende korte Ca^{2+} -piek meetbaar wanneer de stimulus weer wordt verwijderd (Chronis *et al.*, 2007).

Het neurale netwerk rondom ASH is bijzonder complex (figuur 2), wat de functionele ontleding ervan vanzelfsprekend compliceert. Net als bij andere amphide neuronen bezitten de axonen van ASH verbindingen met de zenuwring, de locatie waar allerlei signalen worden geïntegreerd. Naast diverse gap-juncties heeft ASH rechtstreekse synaptische connecties met onder meer voor- en achterwaartse CIs (White *et al.*, 1986; Guo *et al.*, 2009). Wanneer geactiveerde ASH neuronen glutamaat vrijzetten, worden excitatorische AMPA en NMDA-type ionotropische glutamaat receptoren op deze CIs geactiveerd (Bargmann, 2006). Hoewel zowel voor- als achterwaartse CIs door ASH geïnnerveerd worden, is het omkeringscommando dominant. Dit kan zowel aan de meerderheid van verbindingen tussen ASH en achterwaartse CIs te wijten zijn, als aan de vrijstelling van inhibitorische neurotransmitters tussen ASH en AVB (Husson *et al.*, 2012a). Ongeacht de oorspronkelijke

stimulus, veroorzaakt ASH activatie dan een gelijkaardige omkering die vaak door een *omega bend* wordt gevolgd. Men kan dus besluiten dat het ASH neuronenaar een onmisbare factor is voor de levensbelangrijke terugtrekkingsreflex in respons op verschillende, vaak aversieve, stimuli. Vertebraten bezitten analoge cellen, met name de polymodale nociceptieve neuronen waarvan de cellichamen zich in het spinaal ganglion bevinden (Bargmann en Kaplan, 1998).

Het globale verloop van ASH signalering kan men in drie overlappende circuits ontbinden. Eerst zal kortstondige activatie van ASH de achterwaartse beweging stimuleren door AVA/E/D voortdurend te activeren (Guo *et al.*, 2009). Vervolgens worden voorwaartse bewegingen verhinderd doordat omliggende cellen in het ASH functionele netwerk de voorwaartse CIs inhiberen (Piggott *et al.*, 2011). Ten slotte worden spieren in de hoofdregio door de ring interneuronen (RIA) gesensitiseerd. Dit zijn de voornaamste stroomopwaartse partners van de ring motorneuronen die de hoofdspieren innervieren (Tsalik en Hobert, 2003). Door deze indirecte verbindingen signaleert ASH aan onder meer de SMD en RIV motorneuronen. Eerstgenoemde zenuwcellen spelen hoogstwaarschijnlijk een rol in het vervullen van de korte draaihoek terwijl de tweede ervoor zorgen dat de draaibeweging langs ventrale zijde wordt uitgevoerd (Gray *et al.*, 2005).

Belangrijk is dat zenuwcellen die naast ASH ook door de primaire stimulus gerekruteerd worden, het terugtrekkingsgedrag kunnen moduleren. Zo spelen additionele mechanosensorische neuronen (FLP en OLQ) ook een rol in de omkering na mechanische stimulatie van de neus (Chatzigeorgiou en Schafer, 2011; Kaplan en Horvitz, 1993). Hoewel een osmotische shock een sterk gelijkaardig gedrag uitlokt (Hilliard *et al.*, 2005), houden hyperosmolare omstandigheden in vergelijking met *nose-touch* een significant grotere levensbedreiging in. Om onder dergelijke omstandigheden een efficiënte ontsappingsstrategie te volgen, worden de hoofdosillaties om die reden uitzonderlijk tijdens de terugtrekkingsreflex onderdrukt (Alkema *et al.*, 2005). Dit wordt bewerkstelligd door een additioneel circuit van sensorische zenuwcellen en interneuronen dat bovendien onafhankelijk van ASH de terugtrekkingsreflex kan initiëren (Piggott *et al.*, 2011). De aanwezigheid van verschillende neurale circuits die parallel van elkaar de terugtrekkingsreflex mediëren, waarborgt de efficiënte werking van dit cruciale motorprogramma. Bovendien wordt op deze manier ruimte gecreëerd voor modulatie onder invloed van sensorische gewaarwordingen en misschien zelfs ervaring.



Figuur 2: Schematische voorstelling van de connectiviteit van de polymodale ASH nociceptor waarbij gap-juncties en synaptische verbindingen volgens White *et al.* (1986) worden aangegeven. Figuur aangepast van Husson *et al.* (2012a).

1.2 Signaaltransductie

1.2.1 Signaaltransductie in chemosensatie

Het *C. elegans* genoom bezit meer dan 1000 GPCR-coderende genen. Naast de sterk geconserveerde, klassieke GPCRs betrokken in neurotransmissie, wordt geschat dat ongeveer 500 van deze genen coderen voor functionele chemosensorische receptoren (Bargmann, 2006). Deze potentiële chemoreceptoren variëren sterk tussen diersoorten hoewel ze de karakteristieke transmembranaire topologie bezitten. Zo worden biologisch relevante geuren, flink veranderlijk in de loop der evolutie, voor elk species door een andere familie receptoren herkend. Mede hierdoor zijn deze receptoren, die ver verwant zijn met de rodopsine superfamilie van GPCRs, vaak gevoelig voor verschillende structureel gerelateerde componenten. De grote meerderheid van deze vermeende chemoreceptoren wordt overwegend of zelfs uitsluitend in een bepaald chemosensorisch neuronenaar tot expressie gebracht (Chen *et al.*, 2005). Op subcellulair niveau zijn de receptoren exclusief in de microtubuli-rijke sensorische cilia gelokaliseerd (Dwyer *et al.*, 1998). In tegenstelling tot de talrijke olfactorisch neuronen bij zoogdieren, bevat een individueel *C. elegans* chemosensorisch neuron vaak een karakteristieke set aan functionele receptoren (Axel, 2005; Chen *et al.*, 2005).

Het *C. elegans* genoom omvat naast de talrijke GPCRs ook een brede waaier van heterotrimere G-proteïne subeenheden die stroomafwaarts van deze receptoren fungeren. Bovendien bezit de rondworm species-specifieke G_i -achtige *gpa* genen naast de conventionele G_s , G_q , G_o en G_{12} alpha proteïnen (Jansen *et al.*, 1999). Aangezien een mutatie in het *odr-3* gen uit deze groep veruit het grootste effect teweegbrengt op

chemosensatie, blijkt ODR-3 het primaire G-proteïne te zijn in de meeste sensorische neuronen (Roayaie *et al.*, 1998). Bovendien vervult het ook een functie in cilium morfogenese (Lans *et al.*, 2004).

Door hun karakteristieke set van receptoren zijn chemosensorische neuronen vaak toegespitst op de detectie van een specifieke klasse van chemicaliën. Elke klasse neuronen gebruikt hiervoor een eigen signaaltransductiecascade, alhoewel sommige signaalmoleculen in verschillende chemosensorcellen dienst doen (Bargmann, 2006).

1.2.2 Signaaltransductie in mechanosensatie

Genen voor zowel *transient receptor potential* kanalen (TRP) als *Degerin/Epithelial Na⁺* kanalen (DEG/ENaC) worden gemeenschappelijk tot expressie gebracht in de meeste somatosensorische neuronen (Geffeney en Goodman, 2012). Doordat deze op homo- of heteromere wijze tot kationkanalen tetrameriseren, zijn ze uitstekende kandidaten voor mechano-elektrisch transductie (MeT) kanalen. DEG/ENaC genen zijn uitsluitend bij dieren terug te vinden terwijl TRP proteïnen bij alle eukaryoten geconserveerd zijn (Goodman en Schwarz, 2003). TRPs zijn betrokken in diverse fysiologische processen en kennen een grote diversiteit aan *gating*-mechanismen gaande van ligandbinding, veranderingen in voltage of temperatuur, tot covalente modificatie (Nilius en Owsianik, 2011). De term *gating* doelt op het openen (activatie) of sluiten (deactivatie) van ionkanalen. Het merendeel van de primaire mechanosensorische zenuwcellen gebruikt dergelijke TRP kanalen dan ook om mechanische stimuli rechtstreeks in elektrische signalen om te zetten. Minstens enkele TRP kanalen doen dit na aanraking of uitrekking volledig autonoom, terwijl andere dan weer door G-proteïnes geactiveerd worden. Bij zoogdieren is dergelijk systeem ook verwickeld bij sensorische transductieprocessen zoals smaak, zicht en reuk (Kahn-Kirby en Bargmann, 2006). Buiten deze sensorische activiteit, zijn sommige TRP en DEG/ENaC kanalen ook nog betrokken bij signaalfacilitatie of bij versterking van neurotransmissie (Göpfert *et al.*, 2006; Voglis en Tavernarakis, 2008).

In bepaalde somatosensorische neuronen zijn zowel TRP als DEG/ENaC proteïnen vereist om op inwerkende mechanische krachten te reageren, terwijl in andere zenuwcellen slechts één eiwittype een rol speelt (Geffeney en Goodman, 2012). De ongecilieerde TRNs vallen onder laatstgenoemde categorie aangezien TRP genen er niet tot expressie worden gebracht. Externe mechanische stimuli openen er MeT kanalen bestaande uit onder andere de degerenine isovormen MEC-4 en MEC-10. Beide proteïnen colocaliseren dan ook op homogene wijze over de volledige lengte van de sensorische dendrieten (Cueva *et al.*, 2007). Missense mutaties van een geconserveerd glycine in het tweede TM segment van deze genen zullen de mechanisch-verwekte stroom wijzigen, wat aantoont dat bovenvermelde eiwitten een porie-vormende functie vervullen (O'Hagan *et al.*, 2005). Additionele accessoire proteïnen in het membraan, gespecialiseerd ECM en cytoskelet

lijken ook elementair te zijn voor mechanotransductie. Hoe de MeT kanalen in deze TRNs worden geactiveerd, blijft evenwel grotendeels onbekend. Lokale neerdrukking van de sensorische dendrieten zou mogelijks naburige MeT kanalen activeren (Cueva *et al.*, 2007). Voor gecilieerde neuronen stelt het algemeen aanvaarde activatiemechanisme dat inwerkende krachten de cilia ombuigen, samendrukken of uitrekken. Onderlinge verbindingen tussen het MeT kanaal, ECM en het cytoskelet zouden door deze bewegingen onder spanning worden gezet tot het kanaal uiteindelijk opent. Het proces van krachttransmissie en kracht-afhankelijke activatie is in andere MRNs waarschijnlijk analoog.

1.2.3 Signaaltransductie in de ASH nociceptor

ASH zenuwcellen bezitten een scala aan DEG/ENaC en TRP kanalen. Net als de meeste amphide neuronen functioneert het neuronpaar dankzij proteïnen uit de TRPV klasse, OSM-9 en OCR-2 (Kahn-Kirby en Bargmann, 2006). Wanneer beide TRPV eiwitten niet worden geproduceerd gaat de gedragsrespons bij hyperosmolariteit, mechanische en chemische stimulatie van de neus verloren (Colbert *et al.*, 1997; Tobin *et al.*, 2002). In nematoden met een defect *osm-9* vertonen de ASH neuronen bovendien geen of sterk gereduceerde Ca^{2+} -responsen bij blootstelling aan hyperosmotische milieus en aan aversieve chemische componenten, alsook na mechanische stimulatie van de neus bij voedselaanwezigheid (Hilliard *et al.*, 2005). Dit doet vermoeden dat OSM-9 in ASH een centrale rol speelt als transductiekanaal. Bovendien is het kanaal sterk homoloog aan de TRPV1 capsaicin receptor, een belangrijk transductiekanaal in de nociceptoren van zoogdieren (Tominaga *et al.*, 1998). Daarbij kan heterologe expressie van TRPV4 de respons voor hyperosmotische en mechanische stimuli in *osm-9 null* mutanten herstellen (Liedtke *et al.*, 2003).

In ASH neuronen speelt *gpa-3* een voornamelijk rol in chemosensatie en samen met *odr-3* hebben beide Gi-achtige genen een afgelijnde rol in nociceptie. Zo is het vermijden van grote mechanische krachten, osmotische stress en de afstotende stof octanol afhankelijk van *odr-3*, terwijl *gpa-3* de ontwijking van koper, quinine en in mindere mate octanol, mediaert (Hilliard *et al.*, 2004; Lans *et al.*, 2004; Roayaie *et al.*, 1998). Door de sterke betrokkenheid van verschillende G-proteïne subeenheden in ASH signalering, mediëren diverse GPCRs hoogstwaarschijnlijk bepaalde vormen van ASH chemosensatie (Roayaie *et al.*, 1998). Zo zouden sommige receptoren selectief koppelen met specifieke G α -proteïnen, terwijl andere verscheidene G α -proteïnen activeren. Andere G α -genen worden in ASH, weliswaar op lagere niveaus, tot expressie gebracht. Het traditionele model stelt dat Gi-achtige GPA-3 en ODR-3 proteïnes via een nog ongekend mechanisme de synthese van polyongesatureerde vetzuren (PUFAs) promoten, waarna deze op hun beurt direct of indirect TRPV kanalen in ASH activeren (Kahn-Kirby *et al.*, 2004). Fysische stimuli zouden daarentegen rechtstreeks de TRPV kanalen openen (Bargmann, 2006).

1.3 Modulatie van sensorisch gedrag

Sensorische systemen zijn niet statisch, maar kunnen tussen alternatieve gedragsvormen met karakteristieke eigenschappen wisselen. Dergelijke plasticiteit stelt het dier in staat zijn gedrag aan te passen als gevolg van veranderingen van zowel de interne als externe omgeving. Voorbeelden van zulke veranderingen zijn de intensiteit van sensorische signalen, interne nutritionele status en voedselaanwezigheid. Neuromodulators zoals biogene amines of neuropeptiden mediëren deze gedragsveranderingen door de eigenschappen van bepaalde neuronen te veranderen om zo een differentiële informatieverwerking te realiseren (Niacaris en Avery, 2003). Dergelijke plasticiteit komt niet enkel op cellulair niveau tot uiting maar kan ook worden waargenomen als een veranderingen in het functioneel neuronaal circuit. De belangrijkste gedragsmodulator bij de bodemnematode is voedingsbeschikbaarheid, en men kan stellen dat serotonine/octopamine ratio's de nutritionele status definiëren en op antagonistische wijze de meeste cruciale gedragsvormen moduleren (Alkema *et al.*, 2005; Horvitz *et al.*, 1982).

Bij *C. elegans* zijn verschillende neuromodulerende systemen in staat met elkaar te interageren om zo informatie omtrent nutritionele status over verschillende tijdschalen te integreren (Mills *et al.*, 2012). Zo kan een kleine concentratie amine verschillende receptoren doorheen het zenuwstelsel activeren om zo een globale amine en neuropeptide signaleringscascade te initiëren. Naast signaalversterking, worden op die manier ook multipale aanknopingspunten voor modulatie en interactie gevormd. Dit impliceert een extrasynaptisch signaleringsmodel waarbij een humorale pool van monoamines en neuropeptiden basaal signaleert. Wanneer één van deze componenten na detectie van een bepaalde prikkel een hogere productie kent, kan het volledige systeem hierdoor acuut op deze stimulus reageren. Het leeuwendeel van aminergische neurotransmissie vindt dan ook extrasynaptisch plaats, wat al vermoed werd toen bleek dat slechts een fractie van serotonine (5-hydroxytryptamine, 5-HT) receptor-producerende cellen zich post-synaptisch van de serotonergische neuronen bevinden (Harris *et al.*, 2009). Ook neuropeptiden blijken op soortgelijke manier voor intercellulaire communicatie gebruikt te worden. Naast signaalversterking, worden op deze manier multipale aanknopingspunten voor modulatie en interactie gecreëerd (Mills *et al.*, 2012). Dit impliceert dan ook dat het neuronale circuit een veel grotere functionele connectiviteit bezit dan wat voordien anatomisch in kaart werd gebracht (Ezcurra *et al.*, 2011).

2 Optogenetica

Voor velen was de publicatie van het complete neuronale connectiviteitsdiagram de eerste stap naar een allesomvattend begrip van het gedrag van een intact organisme (White *et al.*, 1986). Al snel werd duidelijk dat het *C. elegans* gedrag onmogelijk integraal aan de hand van

dit connectoom te verklaren is. Naast het feit dat uitvoerig bijkomend onderzoek nodig is om te bepalen of synaptische connecties excitatorisch of inhibitorisch fungeren, zijn er bijvoorbeeld ook neurotransmitters in extrasynaptische communicatiepaden betrokken. Analyse van neurale circuits voert men bij de worm traditioneel uit door specifieke cellen via laserablatie te doden of door neurotransmitters genetisch te manipuleren. Dergelijke methodes zijn echter niet in staat neurale activiteit in de tijd te bestuderen en bovendien is de kans op compensatorische activiteit van omliggende neuronen groot. De recent ontwikkelde optogenetica-technologie maakt het mogelijk op non-invasieve wijze de activiteit van individuele neuronen bidirectioneel en reversibel te controleren en het resulterend gedrag in vrij bewegende wormen te analyseren. Deze strategie heeft zich ontpopt tot een krachtig middel om de functie van individuele neuronen binnen een neuronaal netwerk te bestuderen.

Algemeen integreren optogenetische technologieën genetische en optische controle om biologische processen op non-invasieve wijze aan te drijven. Dit doet men door exogene genen coderend voor lichtgevoelige proteïnen in specifieke cellen tot expressie te brengen, waarna men door middel van een lichtflits het cellulaire gedrag van deze cellen kan controleren. De meest voorkomende toepassing van optogenetica is de modulatie van de membraanpotentiaal van exciteerbare cellen. Door gebruik te maken van exogene lichtgeactiveerde eiwitten die de membraanpotentiaal van neuronen veranderen, kan licht als aan-uit schakelaar voor individuele cellen gehanteerd worden. Zo resulteert membraandepolarisatie van zenuwcellen in de activatie van het neuron terwijl hyperpolarisatie een inhiberend effect heeft. Dit vergt aanzienlijke temporele precisie aangezien de elektrische signalen voor neuronale communicatie op milliseconde-schaal tot stand komen. Een conceptueel overzicht van de modulatie van de membraanpotentiaal van zenuwcellen is in figuur 3 afgebeeld. Naast deze conceptuele basis vallen ook andere technologieën binnen het domein van de optogenetica zoals deze voor gerichte beschijning van doelweefsels, strategieën om lichtgevoelige proteïnen in specifieke celpopulaties te introduceren en zelfs methodes voor het navolgen van uitgelokte cellulaire of gedragsveranderingen (Deisseroth, 2011).

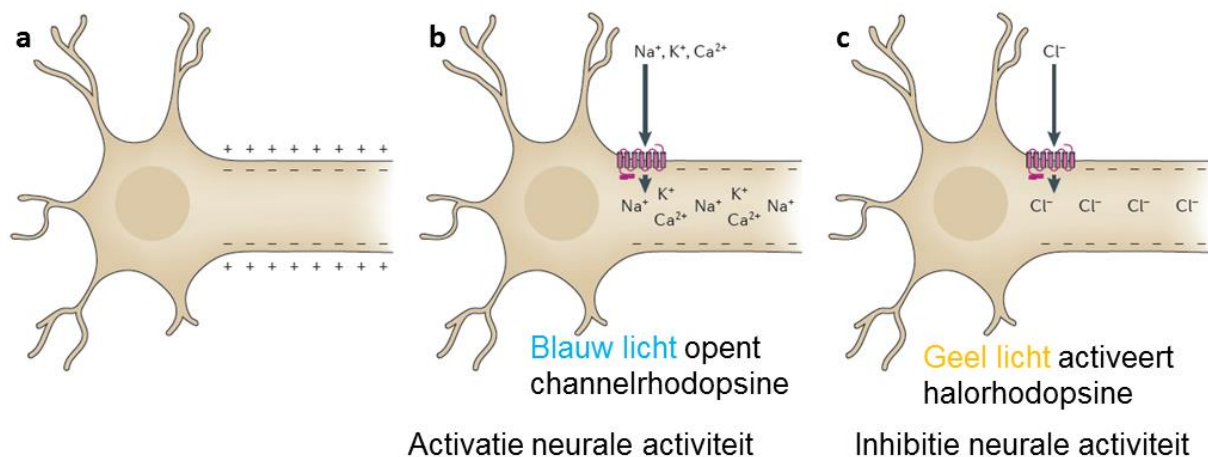
De oorsprong van de optogenetica kan worden teruggevoerd tot studies waarin cascades tussen verschillende genen en synthetische scheikundige stoffen werden ingezet om neuronale signalering te sturen (Banghart *et al.*, 2004; Zemelman *et al.*, 2002). In 2005 conceptualiseerden Ed Boyden en Karl Deisseroth (Stanford) microbiële opsines als fotosensitisatie componenten voor de modulatie van cellulaire activiteit (Boyden *et al.*, 2005). In augustus van dat jaar toonde hun onderzoeksgroep aan dat een microbiële opsine zoogdierneuronen licht responsief kan maken zonder toevoeging van additionele chemische of eiwitcomponenten. Zo werd channelrhodopsine-2 (ChR2) via lentivirale transductie geïntroduceerd in zoogdierneuronen in celcultuur, waarna men met korte lichtpulsen

actiepotentialen op milliseconde tijdschaal kon initiëren (Boyden *et al.*, 2005). Het vuurpatroon van deze neuronen werd dan ook door elektrofysiologische metingen opgevolgd. ChR2 is namelijk in staat na activatie het plasma membraan waarin het ingebed zit te depolariseren. Op hetzelfde moment introduceerde de Gottschalk onderzoeksgroep (Frankfurt am Main) hetzelfde lichtgevoelige ionkanaal in exciteerbare cellen van *C. elegans* waarna ze in vrij bewegende dieren verschillende gedragvormen door belichting konden uitlokken (Nagel *et al.*, 2005). In een eerste experiment werd van de spier-specifieke myosine promotor (*Pmyo-3*) gebruik gemaakt om ChR2 expressie in onder meer *body wall* spieren te bewerkstelligen. Als de nematode met blauw licht beschenen wordt, krimpt de worm door de uitgelokte spiercontracties. Voor een tweede experiment werd het opsine met behulp van de *mec-4* promotor in de TRN mechanosensorische neuronen tot expressie gebracht. Optogenetisch-geïnduceerd gedrag bootste de natuurlijke, door mechanische stimulatie veroorzaakte ontwijking na. Belangrijk is dat de TRN fotoactivatie onafhankelijk van de natuurlijke stimulus plaatsvindt, waardoor andere mechanosensorische cellen die normaal ook door bijvoorbeeld aanraking van de neus worden geactiveerd, niet tot het uitmondend gedrag bijdragen. Bovendien kon ChR2 aanwezigheid de activiteit van MRNs met defectieve MEC-4/MEC-10 mechanosensorische ionkanalen vrijwaren (Huang en Chalfie, 1994). Deze baanbrekende experimenten duiden aan dat men het gedrag van een volledig organisme door middel van *single*-component lichtgevoelige eiwitten kan manipuleren. Ze vormen dan ook de start van een zich uitbreidend onderzoeksveld dat sinds 2006 de naam optogenetica mee kreeg (Deisseroth *et al.*, 2006). Optogenetische technieken hebben de neurobiologie gedurende het afgelopen decennium revolutionair veranderd (Deisseroth, 2011). Desalniettemin maakten slechts een veertigtal publicaties gebruik van optogenetica voor neurobiologisch *C. elegans* onderzoek, waardoor de toepassing van deze technologie in de nematode als innovatief en *state-of-the-art* beschouwd kan worden.

2.1 Optogenetica in *C. elegans*

Verschillende interessante eigenschappen maken van *C. elegans* het uitgelezen organisme voor de toepassing van optogenetische technieken. Door de intrinsieke eenvoud van de bodemnematode zijn de neuronale circuits betrokken bij bijvoorbeeld voortbeweging en leergedrag gemakkelijk te ontleden. Een groot struikelblok in het verwerven van precieze causale controle over intacte neurale systemen is de gerichte activatie of inactivatie van specifieke hersencellen. Dankzij het modulaire karakter van gebruikte optogenetische eiwitten, kan doelgerichte expressie dit overkomen (Schmitt *et al.*, 2012). Bovendien zijn er voor bijna elk van de 302 neuronen uit het compacte zenuwstelsel karakteristieke promotors die transgene expressie in bijna elk zenuwceltype mogelijk maken (Hobert *et al.*, 2010). Via een eenvoudige opstelling voor *whole-field* illuminatie kan een robuuste gedragsrespons uitgelokt worden. Dankzij de verschillende systemen voor automatische videoanalyse is dit gewijzigd gedrag ook kwantificeerbaar. Bij zoogdieren wordt *in vivo* optogenetica bemoeilijkt

door een vaak inefficiënte beschijning van de doelweefsels. Niet alleen dienen optische vezels in de hersenen bevestigd te worden, ook bestaat er dikwijls een grote variabiliteit in de optische eigenschappen van het breinweefsel. Dit maakt dat de uiteindelijke lichtintensiteiten en golflengtes moeilijk te controleren zijn (Yizhar *et al.*, 2011b). *C. elegans* is daarentegen gedurende de levensloop volledig transparant, waardoor men in principe vrij gemakkelijk alle celpopulaties kan beschijnen.



Figuur 3: Conceptueel overzicht van optogenetische technieken voor de modulatie van neuronale activiteit. (a) Ongestimuleerde neuronen hebben een rustmembraanpotentiaal zodat de interne zijde van het plasmamembraan meer negatieve ladingen bezit dan de externe zijde. (b) Channelrhodopsine-2 (ChR2) is een exogeen licht-geactiveerd transmembranair kationkanaal dat bij beschijning opent om vrije doorgang aan kationen te verlenen. Door dit eiwit in specifieke neuronen te introduceren, kan men met behulp van een lichtflits het membraan van de zenuwcel depolariseren zodat de cel geactiveerd wordt. (c) Ionenpompen zoals halorhodopsine worden dan weer gebruikt om neuronale activiteit te inhiberen. Belichting met geel licht activeert de ionenpomp zodat deze chloor ionen tot in de cel pompt. De hyperpolarisatie van het membraan inhibeert de vorming van de elektrische signalen voor neuronale communicatie. Figuur aangepast uit Xu en Kim (2011).

Hoewel de worm geen klassieke licht-transductie systemen bezit, zullen wild-type (WT) nematodes bij intense beschijning met korte golflengtes een omkering veroorzaken. Deze inherente fotofobie behoedt individuen voor schadelijke dosissen zonlicht, en wordt door de neuronale UV-licht receptor LITE-1 uitgelokt (Edwards *et al.*, 2008). Door de *lite-1(ce314)* achtergrond te gebruiken, wordt mogelijke interferentie met het optogenetisch-geïnduceerde gedrag vermeden. Korte lichtpulsjes vermijden weliswaar de fotofobierespons in een WT achtergrond, een strategie die vaak de voorkeur geniet aangezien *lite-1(ce314)* wormen een iets andere voortbeweging kennen (Husson *et al.*, 2013b).

Samenvattend is optogenetica een vernieuwende bijdrage aan de verzameling onderzoeksinstrumenten die de voorbije decennia voor de bodemnematode werden ontwikkeld. Mede door de intrinsieke eenvoud van het organisme, bieden deze en andere ontwikkelde technieken de mogelijkheid om op eenvoudige manier op fundamentele vragen inzake ontwikkeling, gedrag en veroudering antwoorden te zoeken (Xu en Kim, 2011).

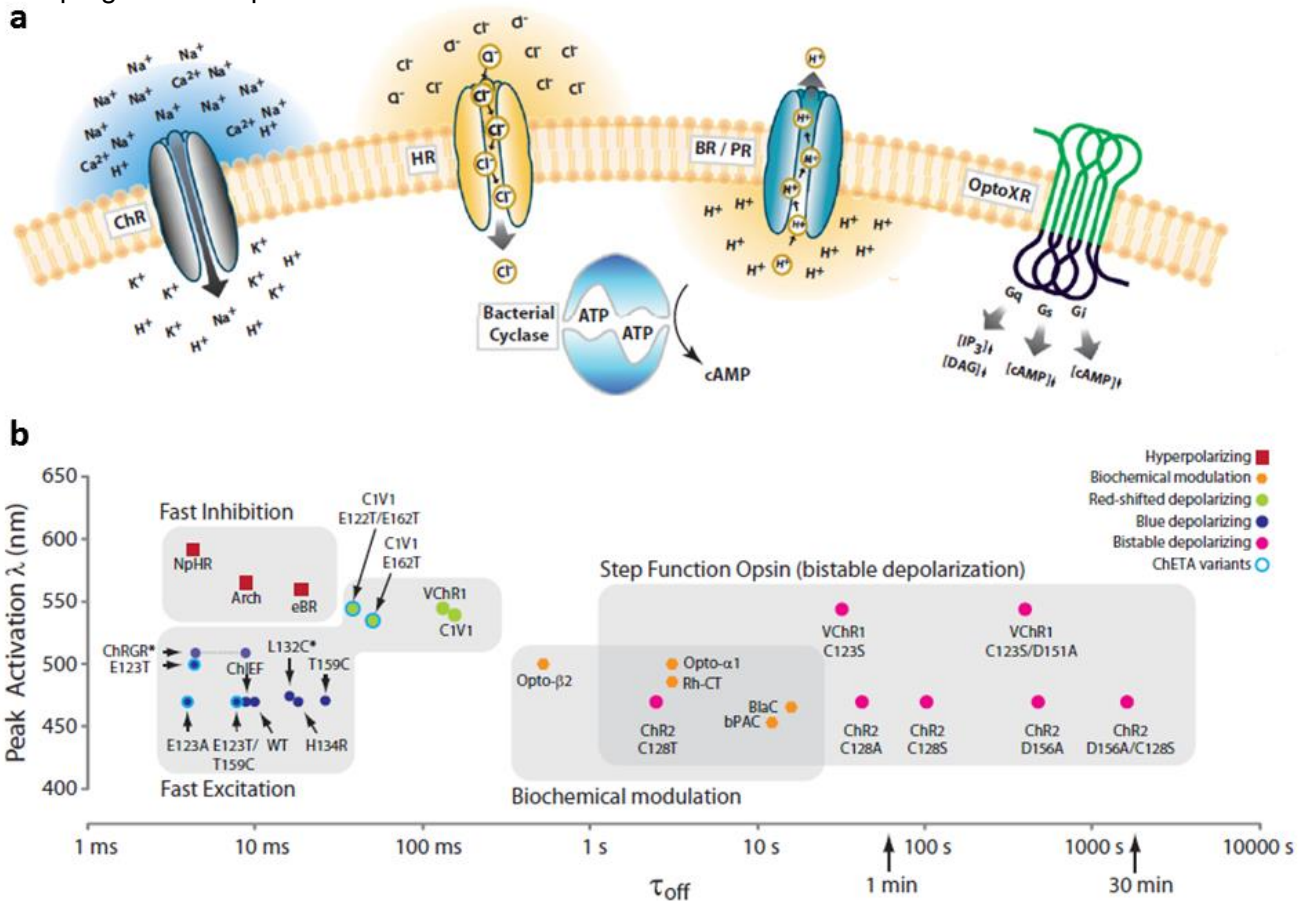
2.1.1 Microbiële opsines als optogenetische proteïnen

Doorheen de evolutie zijn verschillende mechanismes ontwikkeld die organismen in staat stellen licht te benutten in functie van hun overleving. Vertegenwoordigers van de voornaamste klasse lichtgevoelige proteïnen, de 7-transmembranaire rodopsines, worden teruggevonden in alle biologische rijken waar ze een brede en gediversifieerde waaier aan functies bekleden. De term rodopsine verwijst naar het bindingscomplex tussen een opsine en een vitamine-A-gerelateerde organische foton-absorberende cofactor, retinal, die aan bovenstaande eiwitten hun lichtgevoeligheid verleent. Microbiële opsines worden door verschillende prokaryoten gebruikt om protonengradiënten te controleren en zowel de membraanpotentiaal als de ionhomeostase te onderhouden. Bovendien ontwikkelden diverse micro-organismen opsine-gebaseerde fotoreceptoren die fototaxis mogelijk maken. Een *all-trans* retinale (ATR) isoform gaat binnen de transmembranaire (TM) helices van microbiële opsines een covalente binding aan met een geconserveerd lysine, waardoor een geprotoneerde retinal Schiffse base (RSBH⁺) ontstaat. Na fotonabsorptie isomeriseert het chromofoor tot haar 13-cis vorm, waardoor een reeks van eiwitconformatieveranderingen worden uitgelokt. Uiteindelijk wordt, afhankelijk van het soort microbiële opsine, een ionenstroom bewerkstelligd door porie-vorming of iontransfer. Cruciaal in dit proces is dat de retinale chromofoor gedurende de thermisch gedreven *all-trans* reconversie covalent gekoppeld blijft met haar opsine partner (Haupts *et al.*, 1997). Dankzij hun uiterst snelle kinetica en structurele eenvoud (met lichtgevoelig en effector domein gecodeerd in eenzelfde gen) kunnen microbiële opsines benut worden als precieze modulaire fotosensitatie componenten om neuronale activiteit aan hoge frequenties te beïnvloeden (Boyden *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2009).

2.1.2 Diversiteit van microbiële opsines

Initiële experimenten om de eerste microbiële opsines als *single*-component optogenetische eiwitten te benutten, werden bemoeilijkt door talrijke beperkingen, zoals onder andere toxiciteit (Gradinaru *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2008) en onvoldoende controlecapaciteit (Boyden *et al.*, 2005; Gunaydin *et al.*, 2010). Om deze tekortkomingen te verhelpen, werd het repertoire bruikbare opsines in de volgende jaren aanzienlijk uitgebreid en werden de gehanteerde proteïnen moleculair gewijzigd. Zo ontdekte men via vergelijkende genomische analyse nieuwe optogenetische eiwitten zoals het *Volvox* channelrhodopsine-1 (VChR1) uit *Volvox carteri*, archaerhodopsine-3 (Arch) uit *Halorubrum sodomense* en Mac uit de schimmel *Leptosphaeria maculans* (Zhang *et al.*, 2008; Chow *et al.*, 2010; Gradinaru *et al.*, 2010). Analyse van het immense reservoir van microbiële opsines kan cruciale inzichten verschaffen in hun fundamentele werkingsmechanismen. Opsines van eenzelfde klasse vertonen grote sequentie-similariteit tussen verschillende mariene species. Hierbij worden de aan specifieke niches aangepaste actiespectra slechts door enkele aminozuren bepaald. In theorie kan men hierdoor via minieme moleculaire *engineering* de spectrale eigenschappen

van deze genen wijzigen. Reeds ondernomen pogingen hadden echter wisselend succes (Yoshitsugu *et al.*, 2009). Exacte kristallografische structuren en moleculaire *modeling* zijn daarom noodzakelijk om functionele eigenschappen accurater te kunnen afstemmen. Uit de waaier aan beschikbare optogenetische proteïnen kan men het gepaste opsine selecteren in functie van onder meer het beoogde fysiologisch effect, de doelcel of de belichtingseigenschappen. Figuur 4 biedt een overzicht van het repertoire van optogenetische proteïnen.



Figuur 4: Optogenetische eiwitten. (a) De belangrijkste klassen *single*-component optogenetische eiwitten zijn de kationkanalen voor membraandepolarisatie (zoals channelrhodopsines, ChR), chloorpompen (bijvoorbeeld halorhodopsine, NpHR) en protonenpompen (zoals bacteriorhodopsine, BR) voor membraanhyperpolarisatie. Ook lichtgevoelige eiwitten voor de controle van biochemische processen zijn beschikbaar, zoals de membraangebonden G-proteïne gekoppelde (OptoXR) of cytoplasmatische (bacteriële cyclase) receptoren. (b) Optogenetische eiwitten worden doorgaans door hun activatie spectra en inactivatie kinetika gekarakteriseerd. In bovenstaande grafiek worden lichtgevoelige proteïnen volgens hun piek activatiegolflengte en inactivatie kinetika gegroepeerd. Deze groepering illustreert ook dat eiwitten met goed onderscheiden spectrale en tijdsgebonden eigenschappen als afzonderlijke eiwitten in optogenetische experimenten gecombineerd kunnen worden. Figuur uit Yizhar *et al.* (2011b). Arch, archaerhodopsine-3; bPAC, bacterieel fotogeactiveerd adenyllyl cylcase; C1V1, ChR1/VChR1 chimeer; cAMP, cyclic AMP; DAG, diacylglycerol; eBR, *enhanced* bacteriorhodopsine; InsP₃, inositol trisfosfaat; VChR1, *Volvox* channelrhodopsine 1.

2.1.3 Fotostimulatie van exciteerbare cellen in *C. elegans*

Zoals hierboven besproken kunnen microbiële opsines aanleiding geven tot licht-opgewekte stromen indien zij in neuronen geëxprimeerd worden. Het meest gebruikte fotogevoelige activatie-eiwit voor neuronale toepassingen is ChR2 (Boyden *et al.*, 2005; Nagel *et al.*,

2005). Dit proteïne werd na de ontdekking van het eerste gekarakteriseerde channelrhodopsine, ChR1, ook in de unicellulaire groene zoetwater alg *Chlamydomonas reinhardtii* geïdentificeerd (Nagel *et al.*, 2002). Beide eiwitten laten na illuminatie-gemedieerde kanaalopening een passieve en non-selectieve beweging van kationen over het membraan toe en worden door een snelle aan en uit kinetica gekarakteriseerd (Nagel *et al.*, 2003; Tsunoda en Hegemann, 2009).

Het ChR2 excitatiespectrum is gelijkaardig aan dat van GFP, waarbij de excitatiepiek rond 450-460 nm ligt. Wanneer blauw licht door het retinale chromofoor wordt geabsorbeerd, zal de daaruit volgende isomerisatie het ChR-kanaal openen om vrije doorgang te verlenen aan kationen (Na^+ , K^+ en Ca^{2+}). Deze activatie gebeurt op sub-milliseconde schaal terwijl inactivatie ongeveer na 10 ms gebeurt. In tegenstelling tot zoogdierneuronen, waar actiepotentialen worden geïnitieerd eenmaal de membraanpotential een bepaalde depolarisatiedrempelwaarde bereikt, blijven klassieke actiepotentialen uit in *C. elegans*. *C. elegans* neuronnen bezitten namelijk geen *Voltage-Gated Sodium Channels* (VGSC) (Franks *et al.*, 2002). Om deze reden vertonen deze neuronnen *graded* transmissie waarbij de hoeveelheid vrijgezette transmitter rechtstreeks correleert met de omvang van membraandepolarisatie (Goodman *et al.*, 1998). Aangezien ChR2 een lage Na^+ permeabiliteit vertoont, moet ChR2 robuust tot expressie worden gebracht en met hoge illuminatie intensiteiten worden belicht om tot voldoende fotodepolarisatie te komen.

ChRs vertonen een significante homologie met andere microbiële opsines, en dit vooral ter hoogte van de aminozuren die de retinale bindingsgroeve en de ion-conductie bepalen. Dit vormt dan ook een aanwijzing dat de onderliggende translocatiemechanismen deels geconserveerd zijn over de verschillende microbiële opsines (Nagel *et al.*, 2002; Nagel *et al.*, 2003). Vergelijking van de ChR2 fotocyclus met deze van de protonenpomp bacteriorhodopsine (BR) toont inderdaad een sterke gelijkenis aan. Voor ChRs is er wel een duidelijke ontkoppeling tussen fotocyclus en ionpermeabiliteit, in tegenstelling tot pompen die nood hebben aan constante beschijning om het iontransport aan te drijven (Feldbauer *et al.*, 2009). Zo is de ionenflux na de retinale-gemedieerde kanaalopening niet langer van chromofoorisomerisatie afhankelijk, maar van de intrinsieke sluitingskinetica van het kanaal zelf.

De fundamentele biofysische eigenschappen die de kinetische parameters en dus de performantie van individuele ChRs beïnvloeden, zijn de efficiëntie van licht-absorptie, de ionpermeabiliteit en de levensduur van de “open” conformatie. Veel informatie over bovenstaande intrinsieke parameters kan via kristallografische analyse van intermediaire eiwittoestanden worden blootgelegd. Moleculaire modellen van het fototransductie mechanisme leidden al snel tot de ontwikkeling van ChR2 mutanten met gewijzigde

transductie-eigenschappen. Om het depolarisatie effect verder te versterken, werd bijvoorbeeld een *gain-of-function* (gf) mutant van ChR2 gegenereerd door het H134 residu van het TM3 segment tot een arginine te converteren (Nagel *et al.*, 2005). Residu's in deze regio blijken een belangrijke rol te spelen in het bepalen van kinetische parameters en de H134R puntmutatie zorgt nagenoeg voor een verdubbeling van de intrinsieke permeabiliteit van ChR2 voor Na^+ (Butt *et al.*, 1989). Dit opsine werd dan ook in de eerste *in vivo* experimenten in exciteerbare cellen van *C. elegans* tot expressie gebracht om specifieke gedragsvormen uit te lokken na blauw-licht beschijning (Nagel *et al.*, 2005). De ChR2 mutant H134R wordt bijgevolg algemeen gebruikt. Een andere gf-variant, ChR2-L132C (CatCH), vertoont dan weer een gereduceerde inactivatie naast een gelijkaardige hogere influx voor Ca^{+2} ionen (Kleinlogel *et al.*, 2011).

De moleculair gewijzigde ChR2(C128X) varianten bezitten een gemodificeerd C128 residu waardoor de fotocyclus aanzienlijk wordt verlengd. Terwijl de stroom verwekt door WT ChR2 ongeveer 10 ms na illuminatiestop wordt beëindigd, vertonen de T, A en S ChR2(C128X) mutanten inactivatie-constanten van respectievelijk 2 s, 56 s en 106 s (Berndt *et al.*, 2009). Door deze verhoogde kinetische stabiliteit kan één afzonderlijke lichtpuls een stabiele, langdurige wijziging van de membraanpotentiaal veroorzaken. In vergelijking met WT ChRs zijn C128X varianten ook gevoelig voor beduidend lagere lichtintensiteiten omdat het aantal open kanalen accumuleert gedurende een constante lichtpuls (Schoenenberger *et al.*, 2009; Diester *et al.*, 2011). ChR2(C128X) eiwitten worden vaak *step-function* opsines (SFO) genoemd omdat ze in zoogdierneuronen een stapsgewijze controle over de membraanpotentiaal toelaten. Door de membraanpotentiaal net onder de drempelwaarde van de actiepotentiaal te brengen, vergroot de kans op endogene neurotransmissie (Berndt *et al.*, 2009). Bovendien vertonen SFOs een bijkomende binnenweg voor inactivatie. Geel-licht (560-590 nm) belichting van de open conformatie converteert het kanaal namelijk terug in een gesloten toestand waardoor de fotocyclus abrupt wordt beëindigd (Bamann *et al.*, 2008; Stehfest en Hegemann, 2010). Recentelijk werden SFO proteïnes in *C. elegans* tot expressie gebracht om neurale activiteit te manipuleren gedurende de ontwikkeling (Schultheis *et al.*, 2011).

Ook ChR varianten met een kortere fotocyclus zijn beschikbaar. De ChETA mutatie (ChR E123T/A), die een vermoedelijke protonen acceptor met een T of A substitueert, verkort bijvoorbeeld de kanaal-inactivatie kinetika van $\tau \pm 10$ ms tot $\tau \pm 4$ ms waardoor uiterst snelle controle van neuronale excitabiliteit mogelijk is (Gunaydin *et al.*, 2010). Bovendien is deze inactivatie volledig onafhankelijk van de membraanpotentiaal, wat de precisie van fotostimulatie bij hoge frequenties ten goede komt (boven de 200 Hz in vergelijking met deze tot 40 Hz voor WT ChR2 gebruik) (Berndt *et al.*, 2011). Tegelijkertijd betekent een snelle inactivatie wel een verminderde effectieve lichtgevoeligheid daar de verwekte stroom kleiner

is en er minder kanalen in geactiveerde toestand kunnen accumuleren (Gunaydin *et al.*, 2010; Yizhar *et al.*, 2011b).

Ook de combinatie van verschillende TM-helices afkomstig van verschillende ChRs is mogelijk. Dergelijke ChR-chimeren resulteerden door hun verhoogde plasmamembraanlokalisatie reeds in sterkere stromen met gereduceerde desensitisatie, en hebben bovendien andere spectrale eigenschappen (Lin *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009; Yizhar *et al.*, 2011a). Aangezien neuronen synergetisch of antagonistisch kunnen inwerken om een bepaald gedrag te beïnvloeden, is dit gewijzigd actiespectrum in theorie in staat om deze neuronen gelijktijdig maar toch onafhankelijk van elkaar te activeren. Zo kan C1V1 - een chimeer van TM segmenten uit ChR1 en een significant rood-verschoven ChR uit *Volvox carteri* (VChR1) - onafhankelijk van andere ChR varianten in *C. elegans* geactiveerd worden (Yizhar *et al.*, 2011a).

Een belangrijke kanttekening bij al deze moleculaire modificaties is de kans op onverwachte neveneffecten. De H134R mutatie veroorzaakt bijvoorbeeld niet alleen een toename in intrinsieke permeabiliteit voor Na⁺, maar vertraagt de sluitingskinetica ongeveer tweemaal waardoor de precieze tijdsgebonden controle daalt (Gradinaru *et al.*, 2007; Tsai *et al.*, 2009). Dit effect is echter verwaarloosbaar bij fotostimulatie aan lage frequenties en ChR2(H134R) wordt dan ook routinematig gebruikt.

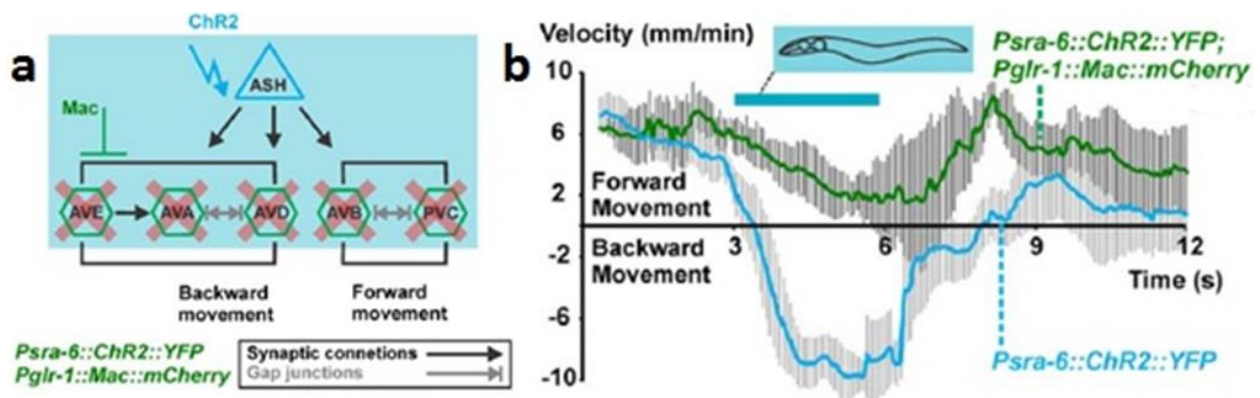
2.1.4 Fotoinhibitie van exciteerbare cellen in *C. elegans*

Door specifieke zenuwcellen tijdelijk uit te schakelen, is men in staat de causale rol van afzonderlijke neuronen in hun circuits en binnen het uitgelokte gedrag te onderzoeken. Opsines die dergelijke functie vervullen, coderen vaak voor lichtgevoelige ionenpompen die na activatie het plasmamembraan hyperpolariseren. Tijdens de zoektocht naar gepaste hyperpolariserende tools werd aangetoond dat de best gekarakteriseerde licht-geactiveerde chloorpomp uit *Halobacterium halobium*, HR, sterk aan desensitisatie onderhevig is (Zhang *et al.*, 2007). Een homoloog gen uit *Natromonas pharaonis*, NpHR (Lanyi en Oesterhelt, 1982), gaf daarentegen aanleiding tot een stabiele influx van chloorionen met een maximale fotostroom bij illuminatie met geel licht van 590 nm (Zhang *et al.*, 2007). ChR2 is niet aan deze golflengte gevoelig, zodat onafhankelijke activatie van beide fotogevoelige proteïnen mogelijk is. Dankzij deze duidelijk onderscheiden actiespectra, kunnen beide probes met calcium-*imaging* gecombineerd worden om bidirectionele optische modulatie en monitoring van neurale activiteit in zoogdier breinweefsel te bewerkstelligen (Zhang *et al.*, 2007). Een gelijksoortig combinatorisch systeem was ook in staat op robuuste wijze het gedrag van vrijlevende *C. elegans* te manipuleren. Aanvankelijk brachten Zhang *et al.* (2007) NpHR via de *myo-3* promotor tot expressie in de spieren. Wanneer ATR opgegroeide individuen

vervolgens belicht werden met geel licht, stopte hun voortbeweging op vaste agar bodems onmiddellijk. Door volledige spierrelaxatie werd tevens ook een significante verlenging van het nematodenlichaam waargenomen. Onder controle van de vesiculaire acetylcholine transporter promotor (*Punc-17*) werd NpHR vervolgens in de cholinergische motorneuronen geïntroduceerd. Ook nu kon een lichtflits de voortbeweging stilleggen, maar ditmaal herstelden de transgene wormen onmiddellijk na belichting. Uit deze observatie concludeerden Zhang *et al.* (2007) dat neuronen waarschijnlijk een efficiëntere Cl⁻ homeostase bezitten, wat een verklaring biedt voor het ontbreken van toxisch effecten na intensieve werking van de chloorpompen. Via expressie in ofwel spieren of in cholinergische neuronen kan NpHR op snelle en omkeerbare wijze de inkrimping tegen gaan die optreedt na ChR2-fotoactivatie van deze cellen. Beide probes kunnen dus simultaan in *C. elegans* spieren of cholinergische motorneuronen getarget worden om voortbeweging bidirectioneel te sturen.

Met het oog op optimale opsine-activiteit moet men niet enkel met intrinsieke factoren maar ook met extrinsieke factoren rekening houden. Hoewel optogenetische hyperpolarisatie door middel van NpHR in neuronculturen en in *C. elegans* kon worden bewerkstelligd, resulteerde de inefficiënte intracellulaire *trafficking* vaak in minimale membraanlokalisatie. Membraanlokalisatie vormt dan ook de voornaamste hinderpaal in doelgerichte expressie van microbiële opsines (Zhang *et al.*, 2007; Gradinaru *et al.*, 2010). Aangezien NpHR net als alle licht-aangedreven pompen door een stoichiometrie van één getransporteerd ion per fotocyclisatie gekenmerkt wordt, is robuuste expressie voor doeltreffende optogenetische inhibitie noodzakelijk. In zoogdieren werd deze gebrekkige membraanexpressie verholpen door in het opsine lokalisatie-motieven van zoogdier membraanproteïnen in te bouwen, wat uiteindelijk leidde tot het gebruik van deze verbeterde probes bij intacte zoogdieren (Zhao *et al.*, 2008; Gradinaru *et al.*, 2008, 2010; Tye *et al.*, 2011). Dergelijke modificaties vormen samen met codon optimalisatie een algemeen toepasbare strategie om heterologe membraanexpressie van nieuwe microbiële opsines te verwezenlijken. Voor NpHR zijn de gebruikte sequenties niet geconserveerd, waardoor een gelijkaardige strategie niet kan worden toegepast bij *C. elegans* (Husson *et al.*, 2012a). Neuronale inhibitie met behulp van NpHR is hierdoor enkel mogelijk wanneer een sterke promotor voor de doelcel beschikbaar is. De NpHR kristalstructuur bezit een sterke structurele homologie met buitenwaartse protonenpompen zoals bacteriorhodopsine (BR) (Kouyama *et al.*, 2010), wat aanduidt dat gelijkaardige eiwitten als krachtige hyperpolariserende modules kunnen worden gebruikt. Na transfectie in gecultiveerde zoogdierneuronen, genereerden twee BR-type protonenpompen, Arch en Mac, inderdaad sterke hyperpolariserende stromen na belichting (Chow *et al.*, 2010). Onder controle van promotoren van gemiddelde sterkte kunnen deze proteïnen bijgevolg neurale activiteit inhiberen (Chow *et al.*, 2010). Een mogelijke complicatie is dat de aanzienlijke protonen efflux die optreedt tijdens continue belichting de ionische homeostase

en extracellulaire pH zou kunnen beïnvloeden. Beide pompen waren echter in staat exciteerbare cellen doeltreffend te inhiberen in *C. elegans*, wat erop wijst dat het sterk gebufferde extracellulaire milieu de zuurtegraad constant houdt (Husson *et al.*, 2012a). Bovendien zijn de actiespectra van deze opsines meer verschoven naar de blauwe regio (lagere golflengten) in vergelijking met NpHR, met excitatiepieken van 566 nm voor Arch en 550 nm voor Mac. In combinatie met hun robuuste werking maakt deze eigenschap beide opsines uitermate geschikt voor het uitvoeren van *circuit-breaking* experimenten. In dergelijke experimenten wordt een neuron met ChR2 geactiveerd, terwijl stroomafwaartse neuronen al dan niet gelijktijdig met behulp van een hyperpolariserend opsine worden geïnhibeerd. Hierdoor kan men de bijdrage van elk individueel neuron aan een bepaald circuit bestuderen, alsook stroomafwaartse zenuwcellen identificeren die nodig zijn voor de verwerking en integratie van signalen. Zo observeerden Husson *et al.* (2012a) dat het locomotorisch programma dat geïnitieerd wordt na ChR2-fotostimulatie van de polymodale ASH nociceptor kon worden geblokkeerd wanneer de stroomafwaartse CIs simultaan door Mac werden uitgeschakeld (Husson *et al.*, 2012a). Vooreerst werd ChR2 onder controle van de *sra-6* promotor voornamelijk in ASH tot expressie gebracht. *Whole-field* blauw licht fotostimulatie kan een robuuste achterwaartse beweging veroorzaken. Doordat deze achterwaartse beweging doorgaans door een *omega bend* wordt gevolgd, lijkt de uitgelokte reactie sterk op de door ASH gemedieerde natuurlijke vermijdingsrespons. Het blauw-verschoven spectrum van Mac laat toe met een simpele opstelling zowel ChR2 als Mac te activeren aangezien blauw licht (450-490 nm) beide opsines rekruteert. Wormen waarbij Mac additioneel in de door ASH-geïnnerveerde CIs werd geïntroduceerd, vertraagden enkel bij *whole-field* illuminatie (figuur 5).



Figuur 5: *Circuit-breaking* experimenten in het ASH circuit. (a) Vereenvoudigde voorstelling van het ASH connectiviteitsdiagram waarbij synaptische verbindingen en gap-juncties aangeduid staan. Gelocaliseerde expressie van ChR2 in ASH (en ASI) sensorische neuronen en Mac in stroomafwaartse *command* interneuronen aangedreven door de promotor van het *glr-1* gen. (b) Wormen met ChR2 expressie in ASH en ASI en wormen waar Mac bijkomend in stroomafwaartse *command* interneuronen werd geïntroduceerd, werden gedurende 3 s met blauw licht beschienen (450-490 nm). Via automatische videoanalyse werd het snelheidsprofiel opgesteld: achterwaartse beweging (negatieve snelheid) voor wormen met uitsluitend ChR2 expressie en lichte vertraging zonder *reversal* bij wormen waarvan de *command* interneuronen Mac produceren. Figuur aangepast uit Husson *et al.* (2012a).

2.1.5 Optogenetica voor biochemische processen

Hoewel optogenetica hoofdzakelijk binnen de context van neurobiologie werd ontwikkeld, kunnen deze technologieën ook aangewend worden om welomschreven intracellulaire biochemische processen, zoals signaaltransductie cascades en moleculaire interacties, te controleren. Meestal bestaan de gebruikte eiwitten uit fusies van licht-absorberende domeinen gecombineerd met proteïne-effector domeinen, en kunnen ze als *single-component* module optische controle uitoefenen. Zo ontwikkelde men een familie van synthetische rodopsines, de optoXRs, door intracellulaire *loops* van het runderrodopsine te vervangen met deze uit diverse GPCRs (Airan *et al.*, 2009). Na fotoactivatie rekruteren deze chimere de pathways aangestuurd door heterotrimere G-proteïnen. Deze strategie gebaseerd op type-II opsines kan gemakkelijk bij intacte zoogdieren worden toegepast aangezien deze voldoende concentraties endogene retinoiden bezitten (Deisseroth *et al.*, 2006). Als alternatief kunnen natuurlijk voorkomende enzymen zoals het licht-geactiveerd adenylyl cyclase (PAC) benut worden om intracellulaire signalering rechtstreeks te moduleren via de productie van *second messenger* moleculen (Ryu *et al.*, 2010; Stierl *et al.*, 2011). Net zoals bij microbiële opsines, moeten de heterologe gastheercellen voldoende concentraties van natuurlijk voorkomende chromofoor-cofactor bezitten alvorens de geïntroduceerde enzymen kunnen functioneren. Rechtstreekse optische controle van kleine GTPases, die resulteren in cellulaire vormveranderingen, werd ook in celculturen gerealiseerd door de modulatie van proteïne-proteïne interacties na belichting (Levskaya *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2011).

Bovenstaande studies wijzen aan dat ook niet-exciteerbare weefsels voorwerp worden van optische controle, wat geïllustreerd wordt door recente publicaties van optogenetische experimenten op onder meer glia, spiervezels en embryonale stamcellen (Deisseroth, 2011). Deze evolutie werd echter nog niet doorgetrokken in *C. elegans*. In principe kan men nu optogenetische eiwitten selecteren in functie van het te onderzoeken weefsel, rekening houdend met de elektrische of biochemische effector functie, snelheid en andere eigenschappen.

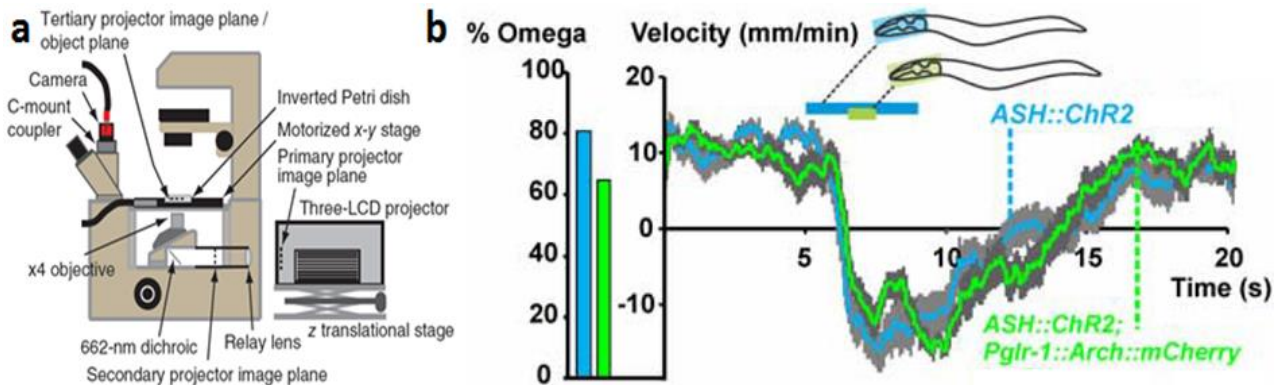
2.2 Kwantificering van optogenetisch-geïnduceerd gedrag

Zoals aangegeven, uiten specifieke gedragsvormen zich hoofdzakelijk op het niveau van de voortbeweging (De Bono en Maricq, 2005). Hoewel vele mutanten met aberrant gedrag visueel onderzocht werden, is de hierbij gehanteerde terminologie vaak onnauwkeurig en/of onvolledig. Bovendien zijn dergelijke fenotypische observaties subjectief en is de afwezigheid van numerieke data belemmerend voor een robuuste statistische analyse. De diverse opstellingen voor automatische videoanalyse maken het mogelijk verschillende aspecten van het locomotorisch gedrag te kwantificeren. Vaak gebruiken de toestellen een gelijkaardige strategie voor dataverwerking waarbij de video opnames van één of meerdere

vrij bewegende wormen op vaste agar bodems eerst in individuele *frames* of foto's worden opgesplitst. Daarna worden deze in binaire zwart-wit beelden omgezet waarbij de ingevulde wormcontouren tegen een volledig witte achtergrond afgetekend staan. De software kan vervolgens diverse voortbewegingsparameters berekenen. Om de snelheid weer te geven gebruiken verschillende *trackers* de verplaatsing van het massacentrum over een serie opeenvolgende frames. Gelijksortige *trackers* zijn dan ook uiterst geschikt om het locomotorisch gedrag van één, of afhankelijk van het systeem, meerdere wormen in parallel te analyseren. De *Parallel Worm Tracker* (PWT) werd bijvoorbeeld gebruikt om drugsgeïnduceerde paralyse van tot 50 wormen in parallel te monitoren (Ramot *et al.*, 2008). Een overzicht van de verschillende systemen vindt men in Husson *et al.* (2013a) terug. *Tracking*-systemen kan men ook rechtstreeks combineren met optogenetische manipulatie van neuronale activiteit. Zo modificeerde de onderzoeksgroep van Alexander Gottschalk de reeds bestaande PWT-software zodat het wormgedrag na belichting met computergestuurde pulsen opgevolgd kan worden. Om deze OptoTracker software te gebruiken, dient een fluorescentiemicroscoop met ingebouwde videocamera aan een computer aangesloten te worden (Husson *et al.*, 2012b). De voornaamste doelstelling van deze studie is de implementatie van de OptoTracker in onze onderzoeksgroep.

Celspecifieke expressie van optogenetische proteïnen is vaak moeilijk te verwezenlijken. Zo bestaan er weinig celspecifieke promotoren en kennen recombinase-gebaseerde systemen maar een relatief beperkt succes (Davis *et al.*, 2008; Macosko *et al.*, 2009). Eenvoudige opstellingen voor *whole-field* illuminatie zijn hierdoor niet langer in staat het gedrag van één bepaald neuron te sturen. Om die reden was immobilisatie noodzakelijk voor de gerichte illuminatie van de lichaamsregio waar de doelcel(len) zich bevinden. Het merendeel van gedragsvormen kon echter niet worden geanalyseerd in deze initiële optogenetische studies. Om deze tekortkoming te overstijgen, ontwikkelden twee onderzoeksgroepen geavanceerde opstellingen waarin precieze ruimtelijke en tijdsgebonden illuminatie van cellen in vrij bewegende wormen mogelijk is (Leifer *et al.*, 2011; Stirman *et al.*, 2011). De software volgt hiervoor de positie van de worm op de rechtstreekse videobeelden op, waarna ze het dier centraal in beeld houdt door een computergestuurde objecttafel aan te drijven. Zo koppelden Stirman *et al.* (2012) een gemodificeerde standaard *liquid crystal display* (LCD) projector aan een stereomicroscoop zodat afzonderlijke lichaamssegmenten kunnen worden beschenen door licht met verschillende golflengtes (Stirman *et al.*, 2012). Multispectrale belichting laat toe verschillende optogenetische eiwitten met karakteristieke spectra al dan niet gelijktijdig te activeren (of te inhiberen). Hierdoor kan men verschillende knooppunten binnen hetzelfde neuronale netwerk nauwkeurig en onafhankelijk van elkaar manipuleren of de integratie van afzonderlijke neurale signalen bestuderen. Ook de temporele aspecten van dergelijke processen kunnen hierbij geanalyseerd worden. Ter illustratie maakten Husson *et al.* (2012a) van deze opstelling gebruik om, analoog aan hoger beschreven *circuit-breaking*

experimenten, de signalering van fotogeeactiveerde ASH neuronen in stroomafwaartse neuronen te blokkeren, wat te zien is op figuur 6 (Husson *et al.*, 2012a). Simultane inhibitie van de CIs via Arch-opsine activatie kan het geïnitieerde locomotorisch programma tijdelijk onderdrukken. Aangezien de achterwaartse beweging bij ASH fotostimulatie hernam na het beëindigen van de inhibitorische lichtpuls, blijken langdurig geactiveerde ASH neuronen continu naar stroomafwaartse CIs te seinen. Dergelijke fysiologie stelt de nociceptor in staat de aanwezigheid van een gevaarlijke stimulus continu te melden zolang deze waargenomen wordt.



Figuur 6: (a) Schematische voorstelling van de opstelling waarin een projector voor multimodale illuminatie wordt gebruikt. Figuur uit Stirman *et al.* 2011. (b) De hoofdregio van ASH::ChR2, *Pglr-1::Arch::mCherry* wormen werd met blauw licht (435-475 nm) voor 2,5 s beschonen. 1,5 s na aanvang van deze lichtpuls werd dezelfde regio met groen licht (543-593 nm) beschonen. Figuur aangepast uit Husson *et al.* (2012a).

3 Doelstellingen

De voornaamste doelstelling van deze masterproef is de implementatie van optogenetische technologieën voor *C. elegans* in de onderzoeksgroep. Het belangrijkste facet in dit proces is de opbouw van het optogenetisch gedragsplatform voor *whole-field* illuminatie en automatische gedragsanalyse door middel van *video-tracking* technologie. De OptoTracker software van dit platform is gecombineerd met fluorescentie microscopie en regelt de belichting van vrij bewegende wormen via computergestuurde lichtpulsen. Tegelijkertijd wordt het optogenetisch-geïnduceerde gedrag door een op de microscoop gemonteerde camera opgenomen, waarna de software diverse voortbewegingsparameters uit deze beelden extraheert. Alternatief kan men ook via een voetpedaal wormen belichten en het gedrag rechtstreeks via de stereomicroscoop volgen.

Hoewel verschillende primaire signaleringsfactoren reeds in ASH werden geïdentificeerd, is minder geweten over modulatie en amplificatie van aversieve signalen binnen deze nociceptor. In een tweede luik van deze studie trachten we cel-autonome spelers te identificeren die een rol spelen in het outputgedrag van de ASH nociceptor. Hiervoor wordt een *C. elegans* lijn met celspecifieke ChR2 expressie in de ASH neuronen gebruikt. Belichting van het volledige nematodenlichaam met blauw licht activeert uitsluitend de ASH zenuwcellen, zodat de natuurlijke vermijdingsrespons wordt nagebootst. Vervolgens hebben

we via RNA interferentie (RNAi) transcripten van kandidaat-genen met vermoedelijke signaleringsfunctie in dit outputgedrag uitgeschakeld. Het effect van deze knockdown werd getest na fotostimulatie van de RNAi worm. Vermits neuronale knockdown bij *C. elegans* bemoeilijkt wordt door een inefficiënte opname van de dsRNA constructen, hebben we eerst een hypergevoelige lijn voor RNAi ontwikkeld. Hiertoe werd SID-1, een transmembranair eiwit dat cruciaal is voor systemische RNAi, pan-neuronaal tot expressie gebracht (Calixto *et al.*, 2010). De resultaten uit de RNAi screening zullen in de toekomst gevalideerd worden door middel van *tracking*-experimenten van genomische deletiemutanten.

Deel II

Experimenteel werk

4 Methoden

4.1 Kweek van *C. elegans*

Doorgaans wordt *C. elegans* op vaste *Nematode Growth Medium* (NGM) agarplaten gekweekt. Aangezien de worm een bacterivore filtervoeder is, worden deze platen met OP50 *Escherichia coli* gezaaid. Deze bacteriestam is uracil-auxotroof, waardoor de beperkte groei de visualisatie en algemene manipulatie van *C. elegans* sterk vergemakkelijkt.

4.1.1 OP50 *Escherichia coli* voedingsbron

OP50 starterculturen, aangekocht bij het *Caenorhabditis Genetics Center* (CGC), worden op een rijk medium zoals LB agar (*Luria Broth*) uitgeplaat. Individuele kolonies worden vervolgens in LB *broth* geïnoculeerd en overnacht in een schudincubator bij 37°C opgegroeid (C25 New Brunswick Scientific C25 Incubator/Shaker). De OP50 LB agar platen en de vloeibare culturen dienen bij 4°C bewaard te worden en zijn doorgaans enkele maanden bruikbaar.

- LB agar: aanmaak door 10 g Yeast Extract powder (Sigma-Aldrich), 5 g Bacto™ yeast (BD Bioscience), 5 g NaCl en 15 g Agar (Sigma-Aldrich) in 1 L gedestilleerd water (*aqua destillata*, AD) te suspenderen. Eenmaal geautoclaveerd de oplossing in standaard petriplaten gieten en bij kamertemperatuur laten opstijven.
- LB medium: aanmaak door 20 g LB medium (Sigma-Aldrich) in 1 L AD te suspenderen en het mengsel te autoclaveren.

4.1.2 NGM groeimedium (*Nematode Growth Medium*)

NGM wordt aseptisch in petriplaten van variërende dimensies gegoten. Zo zijn kleine plaatjes (35 mm diameter) ideaal voor kruisingen terwijl deze van 55 mm diameter (medium) dan weer voor kweek en experimenten geschikt zijn. Vloeibaar NGM kan manueel in platen gegoten worden. Het laboratorium beschikt ook over een geautomatiseerde platengieter (Mediaclave 10 en Mediajet, Integra Biosciences) die constante hoeveelheden medium in 55 mm platen kan gieten. Dergelijke plaatjes zijn het best geschikt voor optogenetische studies doordat men de microscoop na plaatwissel niet opnieuw moet scherpstellen. Indien gewenst kunnen bepaalde antibiotica vlak voor het gieten aan de NGM oplossing toegevoegd worden.

Materiaal en methode:

Aanmaak 1L basale NGM agar:

- 17 g Agar (Sigma-Aldrich)
- 2,9 g NaCl
- 7,5 g Bacto™ Peptone (BD Bioscience)
- Aanlengen tot 1 L met AD en autoclaveren

Eenmaal geautoclaveerd dient de basale NGM agar bij 50°C bijgehouden te worden tot gebruik. Hierdoor verhindert men dat de oplossing vroegtijdig stolt. Vlak voor het gieten wordt de NGM agar aangelengd tot *full* NGM agar door volgende stoffen toe te voegen:

- 1 mL 1M CaCl₂
- 1 mL 5 mg cholesterol / ml ethanol (niet geautoclaveerd)
- 25 mL 1M kaliumfosfaatbuffer
 - o 108,3 g KH₂PO₄; 35,6 g K₂HPO₄; pH 6,0 en 0,2 µm gefilterd (niet autoclaveren aangezien dit neerslag vormt)
- 1 mL 1M MgSO₄

Bij plaatjes bestemd voor optogenetische experimenten werd ook nog 400 µL Fungizone® (Amphotericin B 250 µg/mL, Gibco) en 3,5 mL nystatine (Nystatin suspension, Sigma-Aldrich) aan de *full* NGM gepipetteerd. Naast nystatine en fungizone wordt voor het uitvoeren van de RNAi-screening bijkomend ampicilline (Ampicillin sodium salt, Sigma-Aldrich) tot een eindconcentratie van 50 ng/mL gesupplementeerd.

Voor standaard kweekplaatjes wordt de OP50 bacteriecultuur door middel van conventionele aseptische technieken op het NGM medium gegroeid tot een uniforme bacterielaag ontstaat.

4.1.3 Wormtransfer op NGM platen

Een snelle en eenvoudige manier om wormen tussen verschillende platen te transfereren is *chunking*, een methode waarin men met een afgevlamde scalpel een blokje agar van een begroeide plaat naar een nieuwe plaat overbrengt. Door het blokje met de begroeide kant op een nieuwe plaat te plaatsen, verspreiden de wormen zich snel over de verse bacteriebodem. Deze methode is echter niet geschikt voor het onderhouden van populaties waarvan het nakomelingschap niet uniform is (bijvoorbeeld heterozygote wormen). Wormen kunnen daarom individueel opgepikt en neergezet worden met een afgeplatte platinum metaaldraad bevestigd aan een pasteurpipet. Frequent afvlammen is hierbij handig om contaminatie tegen te gaan.

De transferfrequentie hangt onder andere af van het genotype en de kweektemperatuur. Onder normale kweekomstandigheden (omgevingstemperatuur 20°C en voldoende bacterieel voedsel) vertoont WT *C. elegans* een levensduur van een drietal weken en een generatietijd van ongeveer vier dagen. Bij 20°C worden de nematoden daarom best tweemaal per week naar vers gezaaide platen getransfereerd. Wormen groeien daarentegen 1,3 keer trager bij 16°C waardoor slechts eenmaal per week moet worden gekweekt (Stiernagle, 2006).

4.2 Kruisingsstrategieën

4.2.1 Generatie van mannetjes

Natuurlijke *C. elegans* populaties bestaan hoofdzakelijk uit hermafrodieten die zich via zelfbevruchting voortplanten. Mannetjes vormen daarentegen slechts 0,1 a 0,2 % van de populatie. Aangezien er voor de kruisingen talrijke mannetjes nodig zijn, worden deze eerst gegenereerd, wat via diverse methoden kan gebeuren. De methode in de onderzoeksgroep gehanteerd is een milde heat-shock van L4 individuen.

Materiaal en methode:

- Een plaat met talrijke goed-gevoede L4 wormen wordt gedurende 5/6 uur aan exact 30°C blootgesteld.
- Via *chunking* worden de wormen vervolgens over andere grote platen verdeeld. Onder de nakomelingen van deze wormen komen dan meer mannetjes voor.

4.2.2 Kruisingen opzetten

Kruisingen kunnen eenvoudig opgezet worden door 6-8 viriele adulte mannetjes en een tweetal L4 hermafrodieten op eenzelfde kleine NGM plaat te transfereren. Door een kleine plaat te gebruiken waarvan de bacteriebodem niet uitgesmeerd werd, blijven wormen in elkaars buurt en verhoogt de kans op succesvolle paring. Hierbij worden in de F1 generatie 50% mannetjes gevormd waardoor men mannelijke populaties in stand kan houden door steeds opnieuw mannetjes bij L4 hermafrodieten te plaatsen.

4.2.3 Genotypering strategie: worm PCR

Bij bepaalde kruisingen kan het nakomelingschap visueel nagevolgd worden (bijvoorbeeld bij een dominant fluorescent fenotype van één van de ouders). De aan- of afwezigheid van specifieke allelen kan men via een *polymerase chain reaction* (PCR), al dan niet gevolgd door sequencerig, op het wormlysaat nagaan.

Materiaal:

- REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix with MgCl₂ (Sigma-Aldrich)
- *Custom primers* (Sigma-Aldrich)
- 10X Advantage® 2 SA PCR Buffer (Clontech)
- Proteïnase K (Sigma-Aldrich)

Methode:

- 4 µL van 1X Advantage® PCR buffer met Proteïnase K aan een eindconcentratie van 1 mg/mL wordt in een PCR tube overgebracht.
- Met de *picker* transfereert men vervolgens individuele wormen tot in de oplossing waarna de epjes onmiddellijk voor 15 min op droog ijs worden geplaatst. Deze snelle vriesstap kraakt de cuticula open.

- Door volgend programma kan men ontdooide wormen lyseren (TProfessional Thermocycler, Biometra):
 - 60°C 60': optimale temperatuur voor het proteïnase K
 - 95°C 15': inactivatie van het proteïnase K
- Op het worm lysaat voert men vervolgens de eigenlijke PCR reactie uit.

Toevoegen van

- 12,5 µL REDTaq®
- 9,5 µL dubbel gedestilleerd water
- 1 µL van elke primer (10 µM)

PCR programma (TProfessional Thermocycler, Biometra)

94°C	2'		
25 cycli	94°C	1'	
	xx°C	2'	<i>Annealing</i> temperatuur afhankelijk van het
	72°C	3'	smeltpunt van de primers (doorgaans 55°C)
72°C	2'		

Scheiding op basis van ampliconlengte kan vervolgens door middel van agarose gel elektroforese (AGE). Hiervoor gebruikt men een 1% agarose gel in TAE (40 mM Tris, 20 mM azijnzuur en 1 mM ethyleendiaminetetra-azijnzuur (EDTA)) buffer waaraan de fluorescente stof GelRed™ (10000x stock) tot 1:10000 bij verdund werd. Aangezien de gebruikte REDTaq® PCR Reaction Mix reeds een roodgekleurde *loading dye* bevat, kan het PCR staal rechtstreeks op de gel gepipetteerd worden. Doorgaans worden GeneRuler DNA ladders van 100 bp, 200 bp en 1 kb gebruikt.

4.2.4 Genotypering strategie: sequentieanalyse

Vooraleer het worm PCR staal gesequenced kan worden, dient men het geamplificeerde PCR-product op te zuiveren. Hiervoor werd een Roche High Pure PCR Product Purification kit gebruikt. Een gedetailleerd protocol is bij de kit geleverd. Voor de sequenceren wordt gebruik gemaakt van de klassieke Sanger dideoxynucleotide-methode. Sequenceringsreacties worden met behulp van de BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) uitgevoerd.

Materiaal en methode:

Bij elke 5 µL opgezuiverd PCR product staal mengt men:

- 9 µL dubbel gedestilleerd water
- 3 µL sequencing buffer (5x, Applied Biosystems)
- 2 µL BigDye® Terminator: In deze mix zit naast een mengsel van deoxyribonucleotides (dNTP), PCR-buffer en AmpliTaq® DNA-polymerase ook

terminator dideoxynucleotides (ddNTP) verwerkt die elk met een specifieke fluorescente probe gemerkt zijn.

- 1 μ L van elke primer (3,2 μ M)

Doorlopen sequenceringsprogramma (TProfessional Thermocycler, Biometra):

94°C	2'		
25 cycli	96°C	30"	
	xx°C	15"	<i>Annealing</i> temperatuur afhankelijk van het
	60°C	15"	smeltpunt van de primers (doorgaans 50°C)
60°C	3'		

Hierna worden de reacties van de ongebruikte ddNTP terminators gezuiverd om de sequentiekwaliteit te verhogen. Dit doet men door bij elke 20 μ L oplossing met geamplificeerde product telkens onderstaande reactiemix toe te voegen:

- o 2 μ L ethyleendiaminetetra-azijnzuur (EDTA, UltraPure™ 0.5M EDTA, Invitrogen™) 125mM: dit chelerend agens zal meerwaardige metaalionen binden zodat deze niet tijdens de reacties met het DNA interfereren.
- o 2 μ L natriumacetaat (NaAc) 3M
- o 50 μ L ethanol (EtOH) 95%
- Incubatie van de gemengde oplossingen op kamertemperatuur voor 15 min.
- Centrifugatie aan 13000 toeren per min (tpm) voor 20 min bij 4°C (Thermo Scientific Heraeus® Fresco™ 21). De lage temperaturen zorgen voor een efficiëntere sedimentatie van de sequenties.
- Verwijder het supernatans en suspendeer het sediment in 250 μ L EtOH (70%).
- Centrifugatie aan 13000 tpm voor 10 min bij 4°C (Thermo Scientific Heraeus® Fresco™ 21).
- Na decantatie van het supernatans droogt men het sediment in een verwarmblok bij 90°C (Biometra TRIO).
- Los de stalen in 20 μ L 100mM EDTA op en plaats denatureer geheel gedurende 2 min in het verwarmblok bij 95°C.
- Na 2 min worden de stalen onmiddellijk op ijs afgekoeld zodat de nucleïnezuren enkelstrengs blijven.
- Tenslotte worden de sequenties fluorescent uitgelezen op een 16-capillaire ABI3130 DNA sequencer (Applied Biosystems).

4.3 Optogenetica experimenten bij *C. elegans*

4.3.1 *All-trans* retinal (ATR) plaatjes maken

Aangezien de weefsels van de bodemnematode in tegenstelling tot deze bij zoogdieren onvoldoende endogene retinoïden bezitten, dient ATR aan de OP50 voedingsbron van transgene wormen te worden gesupplementeerd (Nagel *et al.*, 2005). Het weglaten van deze

chromofoor uit de bacterie-houdende bodems vormt dan ook een eenvoudige negatieve controle.

Materiaal:

- NGM-plaat gesupplementeerd met fungizone en nystatine
- Vers opgegroeide OP50 suspensie
- all trans-Retinal (ATR, Sigma-Aldrich)

Methode:

- Bij aankoop wordt ATR in poedervorm geleverd. Bij voorkeur worden dan ook 1 mL aliquots in ethanol gemaakt (100 mM) die men bij -20°C bewaart. Om fotodegradatie te voorkomen worden ATR oplossingen, alsook plaatjes met ATR-bevattende bacteriebodems van het licht afgeschermd.
- ATR suspensie wordt op steriele wijze bij vers opgegroeide OP50 cultuur overgepipetteerd tot een concentratie van 300 µM.
- Breng vervolgens 250 µL van dit mengsel naar ongezaaide NGM plaatjes over.
- Om contaminatie te vermijden wordt de vloeistof best egaal verspreid door de plaat te roteren.
- De bacteriën laat men vervolgens voor twee a drie dagen bij kamertemperatuur opgroeien. Aangezien de plaatjes bij het zaaien erg vochtig zijn, worden deze niet omgekeerd. Ideaal voor het drogen is een doos waarvan de transparante wanden met aluminium zijn afgedekt.

4.3.2 Wormtransfer tot op ATR plaat

Vervolgens kan men de wormen op de ATR platen overbrengen. Dit kan op eenvoudige wijze door L4 individuen over te *picken*. Er wordt echter de voorkeur gegeven aan transfer van eitjes na *bleaching*. Adulte wormen worden door middel van hypochloriet en hydroxide afgebroken terwijl de dikke chitine-wand er voor zorgt dat de vrijgekomen eitjes deze invasieve behandeling doorstaan. De eitjes pipetteert men vervolgens naar een ATR-plaat over. Op deze manier worden de ontwikkelingsstadia van de wormen enigszins gesynchroniseerd. *Bleaching* wordt ook menigmaal gebruikt om contaminaties op kweekplaten weg te werken.

Materiaal:

- ATR-plaat
- NGM-plaat met volgroeide wormen. Het is aangewezen platen met goed gevoede individuen te *bleachen*.
- M9-buffer, een vaak gebruikte fysiologische buffer voor het afspoelen wassen van wormen. Los in 1 L AD volgende componenten op: 5,8 g Na₂HPO₄, 3 g KH₂PO₄, 0,5 g NaCl, 1 g NH₄Cl en autoclaveer dit mengsel.

- 60% sucrose-oplossing
- *Bleaching* oplossing: 0,5 mL NaOH (5M); 1 mL 4% NaOCl

Methode:

- Met behulp van een pasteurpipet met afgeknipt tip de NGM-plaat afspoelen met 15 mL M9-buffer. Wormen collecteert men in een falcontube.
- Centrifugatie aan 1100 tpm voor 4 min bij 15°C (Rotanta 46 R).
- Het supernatans op 3,5 mL na verwijderen met behulp van een pasteurpipet.
- De opgeloste wormpellet aan de *bleaching* oplossing voegen en het mengsel zacht inverteren. Na een viertal minuten breekt ongeveer de helft van de adulte wormen open en drijven de eitjes vrij in de oplossing rond, wat kan gevolgd worden met een stereomicroscop.
- Door 5 mL 60% sucrose aan de oplossing te voegen en de tube zacht te inverteren wordt verdere *bleaching* van de eitjes tegengegaan.

Vanaf deze stap werkt men verder onder de laminaire flow (ESCO Airstream® Class II Biosafety Cabinet)

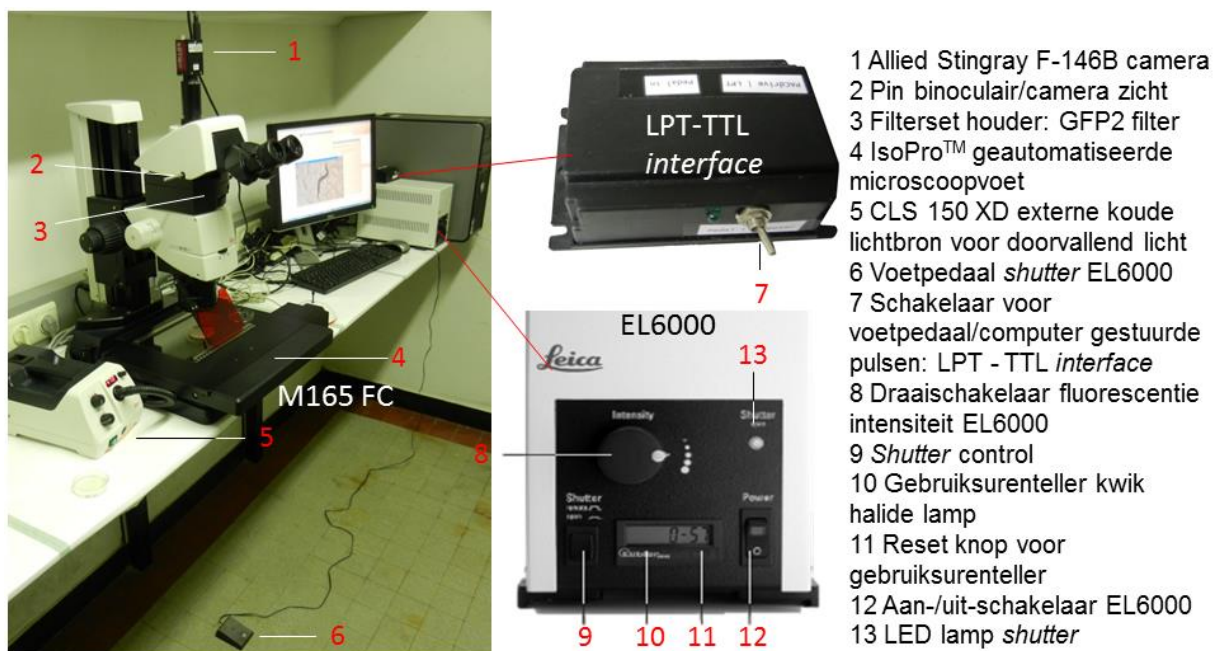
- 2 mL steriele M9-buffer vervolgens zorgvuldig op het mengsel druppelen (zonder te mengen).
- Centrifugatie aan 1100 tpm voor 4 min bij 15°C (Rotanta 46 R).
- Sucrose is tijdens de centrifugatie verantwoordelijk voor de dichtheitsgradiënt waardoor intacte eitjes zich op de scheidingslaag tussen sucrose-javel en M9 verdelen. Met behulp van een steriele pasteurpipet brengt men de eitjes over naar een nieuwe falcontube die 10 mL M9 bevat.
- Centrifugatie aan 1100 tpm voor 4 min bij 15°C (Rotanta 46 R).
- Verwijder het supernatans op 2 mL na en voeg 10 mL M9 buffer toe.
- Centrifugatie aan 1100 tpm voor 4 min bij 15°C (Rotanta 46 R).
- Verwijder het supernatans op 400 µL na. Met een pipet kan men een kleine hoeveelheid eitjes opzuigen en naar een verse ATR-plaat brengen. Eenmaal gedroogd bewaart men de plaat omgekeerd bij 20°C.
- Wormen worden bij 20°C in het donker opgegroeid. In deze studie werden voor optogenetische gedragstesten stevast adulte, doorgaans gravide, wormen gebruikt.

4.4 Opbouw van de microscoop en bijkomende hard- en software

In deze studie wordt een Leica M165 FC fluorescente stereomicroscop gebruikt waarvan de *shutterbox* van de fluorescente lichtbron zowel aan een computer als aan een voetpedaal werd gekoppeld. Hierdoor kunnen de lichtpulsen manueel of door de computer aangestuurd worden. Wanneer de externe lichtbron voor fluorescentie uitgeschakeld is, maakt de M165 FC microscoop enkel van doorvallend licht gebruik. Het doorvallend licht, afkomstig van een externe Leica CLS 150 XD halogene lichtbron, levert sterk contrasterende beelden van het

specimen op. Voorts laat de geautomatiseerde microscoopvoet (Leica IsoPro™ *automatic mechanical stage*) het verschuiven van de plaatjes toe zonder de voortbeweging van de onderzochte wormen drastisch te verstoren.

Aan deze stereomicroscoop werd via een videotube (Leica 10447367, 0.63x Video Objective) een Allied Stingray F-146B digitale camera gemonteerd. Beelden van deze digitale camera worden via een FireWire verbinding tot aan een computer gebracht. Via een uitschuifbare pin aan de linkerkant van de oculairlenzen kan het licht afkomstig van het specimen ofwel naar beide oculairs ofwel naar de camera afgeleid worden. Een overzicht van de gebruikte apparatuur is op figuur 7 weergegeven (figuur A1 in het addendum biedt een gedetailleerder overzicht van de opstelling).



Figuur 7: Opstelling van het optogenetisch gedragsplatform voor *whole-field* illuminatie van *C. elegans* en automatische gedragsanalyse door middel van video-tracking technologie.

4.4.1 Leica EL6000 externe lichtbron voor fluorescentie

De microscoop maakt gebruik van een Leica EL6000 externe lichtbron voor fluorescentie. Licht van deze kwikhalide lamp wordt via een glasvezel tot aan de microscoop gevoerd, wat verhitting van de microscoop en het specimen voorkomt. Bovendien heeft de lamp een zeer lange levensduur waardoor deze ideaal is voor langdurige experimenten die een uniforme illuminatie vereisen. Doorgaans wordt deze compacte lichtbron gebruikt om continu het onderzochte object te beschijnen, maar door een ingebouwde sluiters, of *shutter*, die al dan niet het licht blokkeert, kan men de belichtingstijden controleren. De sluiters kan aan het toestel zelf in- of uitgeschakeld worden door een schakelaar op het controle-paneel, en is "open" wanneer een groen LED-lampje op de module oplicht. Voor optogenetische experimenten kan de *shutter* echter van op afstand gecontroleerd worden via een voetpedaal of doormiddel van computergestuurde pulsen. Hiervoor dient de schakelaar op het toestel in

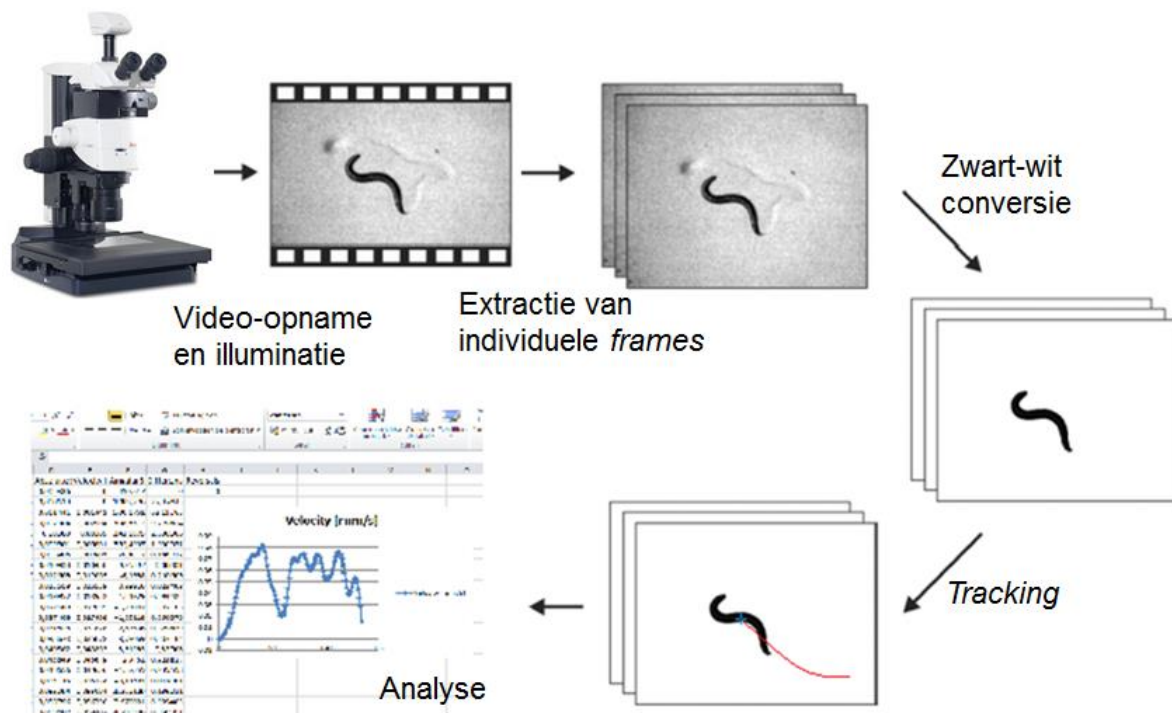
“remote” toestand te staan (pijl 9 op figuur 7). Voorts kan men de helderheid manueel in vijf posities variëren (0% - 100%) dankzij een draaischakelaar op het controlepaneel die een mechanische dim-eenheid binnen het toestel controleert. Frequent aan- en uitschakelen van deze lichtbron dient men te vermijden vermits dit de levensduur van de lamp drastisch vermindert.

Vooraleer licht afkomstig van de EL6000 module het specimen bereikt, passeert het nog een excitatiefilter die selectief de excitatiegolflengtes uit de illuminatie-lichtbundel doorlaat. Deze filter is samen met twee sperfilters voor het visuele stereobeeld in een filterset terug te vinden, een systeem dat door de fabrikant als het FLUOIII® *filter system* benoemd wordt. Maximaal vier verschillende filtersets kunnen in de roteerbare revolver gemonteerd worden. Lege gleuven dienen met een dummy gevuld te worden. In de dummy bevinden zich in plaats van de sperfilters twee lege openingen voor de observatielichtbanen terwijl de derde lichtbaan gesloten is om oogschade door accidentele blootstelling aan intense lichtstralen te voorkomen. Men mag de dummy wel niet langer dan 15 seconden met de hoog energetische lichtbundel beschijnen aangezien het systeem zo zou verhitten. Het is daarom aangewezen via de UV *shutter* op de microscoop de illuminatie-lichtbundel te blokkeren wanneer men kort zonder fluorescentie wilt werken. Voor fotoactivatie van ChR2 werd in deze optogenetische studie de GFP Plus filter set van Leica gebruikt (aangeduid als GFP2, met een 480/40 nm excitatie filter (460-500 nm) en een 510 LP (*longpass*) sperfilter).

4.4.2 OptoTracker

De OptoTracker software maakt het mogelijk om op computergestuurde wijze transgene neuronen in vrijbewegende wormen te stimuleren of te inhiberen en vervolgens het resulterende gedrag te kwantificeren. Het programma werd door de onderzoeksgroep van Alexander Gottschalk opgesteld door de publiek beschikbare Matlab scripts van de *Parallel Worm Tracker* (PWT) (Ramot *et al.*, 2008) voor optogenetica te modificeren (Husson *et al.*, 2012b). Via de PWT kan men via een microscoop-gekoppelde camera videobeelden van *C. elegans* maken. Eenmaal opgenomen, identificeert de software wormen op alle individuele *frames* van de opname en wordt de positie van elke worm er bepaald door middel van het massacentrum (*centroid*). De *tracker* houdt ook informatie omtrent de afmetingen van de geïdentificeerde wormen per *frame* bij. Uit de analyse van deze tracks kunnen bepaalde gedragsparameters zoals snelheid, hoeksnelheid en het voorkomen van achterwaartse bewegingen nagegaan worden. De Gottschalk groep breidde de PWT uit met een *shutter* module, die de sluiters van de EL6000 fluorescente lichtbron kan aansturen. Hierdoor kan men de lengte en het interval van de lichtpulsjes programmeren en deze met de video-opnames synchroniseren. De scripts van de OptoTracker zijn samen met een uitgebreide handleiding vrij te downloaden op de website van de Gottschalk onderzoeksgroep (<http://www.biochem.uni-frankfurt.de/index.php?id=236>).

De basissoftware die nodig is om de OptoTracker operationeel te maken is het MATLAB[®] platform (The MathWorks Inc.), uitgebreid met de Image Processing Toolbox[™] en de Image Acquisition Toolbox[™]. Via een gebruiksvriendelijke *graphical user interface* (GUI) kunnen individuele gebruikers de instellingen van de vier modules wijzigen. Zo bestaat de software uit een *video capture* module, de *worm tracker*, een sectie voor het bekijken en analyseren van opgenomen tracks en een *shutter* module voor het aandrijven van lichtpulslen. Naargelang de opstelling dient men de parameters van deze modules manueel af te stellen. Dit is cruciaal aangezien onder meer het belichtingsprogramma, de vergroting en het ontwikkelingsstadium van de wormen voor elk experiment variëren. Per programma gebeurt dit via het *Settings* paneel aan de rechterkant van de GUI. Een conceptueel overzicht van het worm-tracking proces van de OptoTracker vindt men in figuur 8.



Figuur 8: Conceptueel overzicht van het worm-tracking proces. Een aan de microscoop gemonteerde camera maakt videobeelden van een vrij bewegende worm terwijl deze door computergestuurde pulsen belicht wordt. Individuele *frames* uit deze opnames worden vervolgens tot zwart-wit beelden geconverteerd, waarna de software objecten van vooraf ingestelde dimensies als wormen identificeert. De verplaatsing van het massacentrum van dergelijk object over verschillende frames worden als track gebundeld. Verschillende parameters kunnen uit deze tracks berekend worden. Figuur aangepast uit Husson *et al.* (2013a)

4.4.2.1 De VideoCapture module

Deze module is compatibel met een camera die 640x480 grayscale (8-bit) opnames in AVI formaat maakt. Indien een camera met een hogere resolutie aan de opstelling wordt gekoppeld, kan men via de *imresize* functie van MatLab de resolutie tot 640x480 pixels reduceren. Opnames worden rechtstreeks in AVI formaat opgeslagen in de folder gespecificeerd in het *Capture Path* vakje (aan het einde van de mapnaam moet hiervoor nog een backslash staan). Via *Capture Every* kan men een serie opnames maken met constante

tijdsduur (in te stellen via *Capture time*) en volgens een bepaald tijdsinterval. Zo krijgen de verschillende korte filmfragmentjes automatisch een volgnummer, waardoor de WormTracker ze later efficiënt achtereenvolgens kan analyseren. Wanneer men *Capture Every* aan *Experiment Duration* gelijkstelt, wordt slechts één filmpje gemaakt. MatLab is echter niet in staat opnames van meer dan 6300 frames te maken waardoor de opnameduur tot 420 seconden, met 15 frames per seconde, gelimiteerd wordt.

Door de *Preview Video* knop in te drukken krijgt men het *real-time* videobeeld in een nieuw venster te zien. Dit is niet alleen handig om de worm te centreren maar ook om bijvoorbeeld de focus en zoom aan te passen. De beeldkwaliteit vergt veel aandacht aangezien een goed contrast tussen worm en achtergrond cruciaal is voor de latere zwart-wit conversie. Microscopen met doorvallend licht zijn hiervoor ideaal. In dit opzicht moet men ook met de plaatkwaliteit rekening houden. Zo moet de vaste agarbodem waarop de wormen zich bevinden zo egaal mogelijk zijn. Het is bijvoorbeeld aangewezen om voor de opnames verse volgroeide bacteriële voedingsbodems te gebruiken omdat deze nog geen uitgebreid netwerk van groeves veroorzaakt door bewegende wormen vertonen. Het doorvallend licht wordt beter niet in *relief* modus gezet aangezien hierdoor oneffenheden op de testplaatjes worden geaccentueerd.

4.4.2.2 De Shutter module

De computer kan de lichtpuls van de EL6000 lichtbron aandrijven door via de LPT (parallele, *Line Print Terminal*) printpoort TTL (*Transistor-Transistor Logic*) pulsen uit te zenden. De opstelling maakt uit veiligheidsoverwegingen van optocoupler gebruik zodat de signalen afkomstig van de computer naar het circuit van de sluiters worden overgedragen zonder dat beide schakelingen elektronisch verbonden zijn. Via een tuimelschakelaar kan men overschakelen van LPT-gecontroleerde TTL pulsen naar manuele controle via het voetpedaal (aangeduid door pijl 7 op figuur 7). Een schematisch overzicht van de gebruikte schakelingen is in het addendum terug te vinden. Door in de OptoTracker de *Shutter Settings*-knop aan te klikken wordt opnieuw een GUI geopend waar ditmaal alle illuminatie-instellingen aanpasbaar zijn. Via *Start Delay* kan men in seconden de tijd tussen opnamestart en de eerste opening van de sluiters instellen. Voor optogenetische gedragsanalyse kan men door een ruime *delay* het locomotorisch gedrag voor de lichtpuls duidelijk vergelijken met het optogenetisch-geïnduceerd gedrag. Via *Light for* wordt de belichtingsduur in milliseconden bepaald terwijl men via *Wait* en *Repeat for* verschillende illuminaties binnen eenzelfde opname kan bewerkstelligen.

4.4.2.3 De WormTracker module

De WormTracker zal automatisch wormen identificeren en traceren. Als initiële stap worden individuele frames hiervoor naar binaire zwart-wit beelden omgezet door objecten die boven een bepaalde grijswaarde vallen volledig zwart in te kleuren. Pixels die deze drempelwaarde

niet bereiken, kleuren daarentegen wit. De OptoTracker heeft hiervoor een ingebouwde *thresholding*-functie maar het is echter aangewezen deze conversie uit te voeren via een extern programma zoals het vrij downloadbare VirtualDub (<http://virtualdub.sourceforge.net/>) te doen. Hierdoor kan men per conditie de *processing*-parameters handmatig instellen om wormen optimaal tegen een witte achtergrond af te tekenen. Ook kan men op eenvoudige wijze lange filmfragmenten verknippen tot het beoogde illuminatie-opgewekte gedrag ideaal in beeld is gebracht.

Verwerkte opnames kunnen vervolgens in de WormTracker ingevoerd worden door de padnaam gevolgd door een backslash te typen in de GUI van de module. Om een serie opnames te *tracken*, dient men de eerste en laatste volgnummers in de *Start* en *End* vakjes in te voeren. Bij het *tracken* worden voor elk frame bepaalde eigenschappen voor elk object, zoals dimensies en de coördinaten van het massacentrum, afgeleid. Tracks worden opgesteld door de massacentra van objecten die zich over opeenvolgende frames niet teveel verplaatst hebben aan elkaar te verbinden. Voor elke track worden per frame de geregistreeerde eigenschappen in een .mat document geëxporteerd dat dezelfde naam draagt als het oorspronkelijke videofragment.

Voor een efficiënte *tracking* moeten de minimale en maximale afmetingen (in pixels) van objecten die de software moet herkennen als individuele worm ingevoerd worden voor elk experiment. Door de *Min* en *Max Single Worm Area* parameters zorgvuldig te kiezen in functie van camera resolutie, zoom en het ontwikkelingsstadium van de onderzochte wormen, worden kleine oneffenheden op de testplaatjes zoals stofdeeltjes genegeerd. Een goed gekozen maximale waarde zorgt er bovendien voor dat wanneer twee wormen met elkaar botsen, hun gecombineerde oppervlakte deze waarde overschrijdt en beide tracks afgebroken worden. Wanneer beide wormen vervolgens van elkaar scheiden, worden nieuwe tracks gestart.

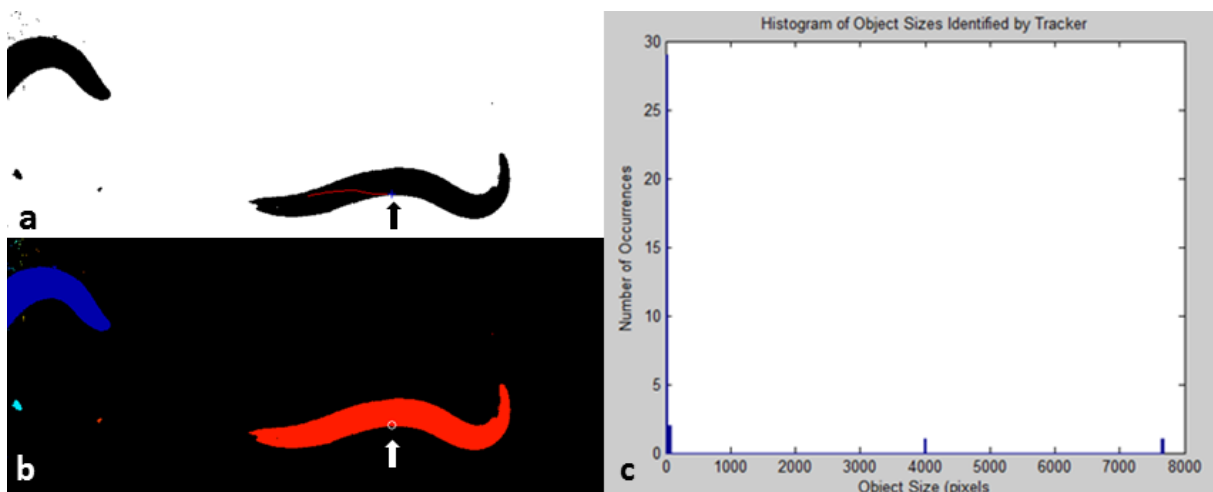
Voorts zijn nog drie parameters wijzigbaar, hoewel de vooraf ingestelde waarden gepast zijn voor de meeste experimentele condities:

- *Maximum distance traveled by worms between succesive frames*: Dit geeft de maximale afstand weer in pixels dat een massacentrum tussen opeenvolgende frames mag overbruggen. Deze waarde is afhankelijk van de vergroting en wanneer overschreden, wordt de track afgebroken.
- *Minimum valid track duration*: Tracks korter dan deze drempelwaarde worden niet in rekening gebracht waardoor wormen die kortstondig in beeld passeren de *tracking* niet beïnvloeden. Doorgaans is een waarde van 10 frames hiervoor gepast.
- *Maximum size change between successive frames*: De WormTracker stopt de track wanneer de afmetingen van een object tussen opeenvolgende frames deze waarde

van 100 pixels overschrijdt. Net zoals bij de *Max single worm area* parameter kan men hierdoor botsingen buiten beschouwing houden.

De vooruitgang van het *tracking*-proces kan via verschillende grafieken, aangevinkt in het *Tracker Tune-up Tools* menu, gevolgd worden (zie figuur 9). Deze informatie is daarenboven nuttig bij het afstemmen van de diverse *tracking*-parameters.

- *Plot Color-Coded Objects*: Via deze functie krijgt men een kleur-gecodeerde afbeelding te zien van alle objecten gedetecteerd door de tracker. Witte cirkeltjes duiden het massacentrum van de objecten aan die binnen de afmetingsdrempelwaarden vallen. Indien een individuele worm door een slecht ingestelde *Max single worm area* parameter in verschillende objecten wordt gefragmenteerd, zal de worm verschillende kleuren bezitten.
- *Pause After Plotting Tracker Progress*: Indien deze optie geactiveerd is, pauzeert de WormTracker na het weergeven van de grafieken, die de vooruitgang van het *tracking*-proces tonen. De frequentie waarbij dit gebeurt kan men via *Plot Tracker Process Every* ingeven. Doordat de analyse slechts terug aanvangt wanneer er een willekeurige keyboardtoets ingedrukt wordt, heeft men voldoende tijd om de vooruitgangsgrafiek(en) door te nemen. Idealiter krijgt enkel de belichte worm een doorlopende track over het verloop van het filmpje aangewezen.
- *Plot Histogram of Object Sizes*: Per frame wordt een histogram met de oppervlakte in pixels van elk object weergegeven. Deze informatie is dan ook zeer handig om drempelwaarden voor de wormdimensies in te stellen.



Figuur 9: Verloop van de *tracking*. (a) In elk zwart-witframe worden objecten binnen de ingegeven dimensiegrenzen als worm geïdentificeerd. Het massacentrum is door een blauw kruisje voorgesteld (zwarte pijl) terwijl de rode lijn de reeds opgestelde track weergeeft. Een worm die kortstondig in het randgebied van het beeld passeert, wordt niet als worm geïdentificeerd. (b) Afgelijnde objecten krijgen een eigen kleurcode in de *Color-coded Plot*. Het massacentrum van de geïdentificeerde worm wordt met een wit cirkeltje (witte pijl) aangeduid. (c) De oppervlakte van elk object worden in een afzonderlijk histogram weergegeven.

4.4.2.4 De WormAnalyzer module

Na het *tracken* van wormen in elke opname kunnen de resulterende data in de *WormAnalyzer* geanalyseerd en bekeken worden. Hiervoor wordt de track-file boven het originele videofragment geplaatst. Vervolgens kunnen individuele of gegroepeerde tracks geanalyseerd worden om onder meer snelheid, hoeksnelheid en voorbewegingsrichting te extraheren. Bovendien kan deze module automatisch *pirouettes* identificeren.

Binnen de GUI van de module staan alle essentiële commando's onder het *Tracks* menu. Na het selecteren van een track file via *Opening Tracks Files*, dient men het aantal filmpjes geassocieerd met dit document in te geven. Doorgaans is er slechts één opname gebruikt en wordt deze na selectie onder de eerste track weergegeven. Indien de originele opname 2GB overschrijdt, is deze echter in twee .avi bestanden opgesplitst. Na het *tracken* van elk individueel filmpje, dienen beide tracks dan ook met elkaar verenigd te worden met behulp van de *JoinTracks* functie. Bij het invoegen van beide filmfragmenten worden deze gecombineerde tracks dan ook boven de continue opname, die maximaal 4GB omvat, geplaatst.

Na het invoegen van de track en corresponderende video-opname, wordt de eerste track uit het .mat bestand in het rood bovenop de eerste frame van het filmpje getoond. Voorts stelt een blauw kruisje het massacentrum van het object in de track voor. Via een schuifbalk in de rechter bovenhoek van het venster kan men doorheen alle tracks scrollen, en indien nodig foutieve tracks (bijvoorbeeld toegekend aan stofdeeltjes) verwijderen. Dit gebeurt via de *Deleting Invalid Tracks* toets die de huidige track knipt, waarna de *Save Tracks File* knop elke verandering opslaat. Via *Playing Back Tracks* kan elke individuele track terug worden afgespeeld en teruggespoeld. De snelheid waarbij dit gebeurt is via het *Preferences* menu in het *Fast Forward Speed* vakje aanpasbaar.

De eigenlijke analyse kan zowel op individuele als gegroepeerde tracks uitgevoerd worden. Voor analyse van een individueel geselecteerde track via het *Analyze Current Track* commando worden de resultaten in een aparte figuur weergegeven. Zo worden, indien aangevinkt in het *Preferences* menu, ogenblikkelijke richting, snelheid en hoeksnelheid tegen de tijd uitgezet. Om deze data op te slaan moet de *Save Tracks File* toets aangeklikt worden. Door *Analyzing All Tracks in an Experiment* onder het *Tracks* menu te selecteren worden de resultaten daarentegen rechtstreeks in een .mat bestand opgeslagen waarvan de gebruiker de naam moet ingeven. Door de resultaten onder de originele tracks file te bewaren, worden alle data samengevoegd. De resultaten van de analyse kunnen ook in Excel gevisualiseerd worden. Hiervoor biedt het *Export to Excel* menu twee opties. In een eerste optie worden de positie van het massacentrum, de richting (*Direction*, [°], 0 = noord), absolute snelheid (*Absolute Speed* [mm/s]), snelheid (*Velocity* [mm/s], met voor- en achterwaartse beweging respectievelijk positief en negatief), hoeksnelheid (*Angular Speed* [°/s]), verschil in richting

(*Difference in Direction* [°]) en het aantal *reversals* in een track uitgezet. Als tweede optie kunnen de data naar een *common* Excel document geëxporteerd worden. Aangezien de OptoTracker als *centroid*-gebaseerde *tracker* moeilijk het onderscheid maakt tussen voor- en achterwaartse beweging, is het mogelijk via Excel het teken van alle snelheden te inverteren.

Ook nu kan men de analyseparameters afstellen via de *WormAnalyzer* knop in het *Settings* paneel.

- *Analyze & Display*: In dit vak kan men selecteren welke grafieken er bij de analyse van een individuele track moeten worden weergegeven. Deze visualisatie, die trouwens niets aan de data wijzigt, kan echter niet rechtstreeks naar Excel geëxporteerd worden maar kan men wel als een MatLab figuur opslaan.
- Via *Tracker* zijn de *Sample Rate* (aantal *frames*/seconde) van de opnames als de *Calibration Factor* (pixels/mm) instelbaar. De *Calibration Factor* is cruciaal voor precieze snelheidsberekeningen en bepaalt overigens de snelheid waarmee de tracks afspelen.
- *Track Analysis: Sliding Window for Smoothing Track Data* is het aantal *frames* aan weerszijden van een individueel *frame* die in rekening wordt gebracht wanneer de *WormAnalyzer* de parameters berekent. *Step for Calculating Worm Speed* doet hetzelfde voor de ogenblikkelijke snelheid. Bij een waarde van 1 worden opeenvolgende *frames* gebruikt, terwijl een waarde van 2 aanduidt dat de verschillen berekend zijn tussen *frames* gescheiden door twee *frames*. Een hoge waarde zal dus effen grafieken produceren, maar maskeert mogelijks kleine en bruuske bewegingen.
- *Pirouette Identification: Threshold for Pirouette ID* stelt de hoeksnelheid in vanaf dewelke een pirouette (omkering) wordt geïdentificeerd. Empirisch werd deze waarde op 110°/s geschat. Pirouettes kunnen bestaan uit één enkele omkering, onder de vorm van een *reversal* of een *omega bend*, of een serie van omkeringen gescheiden door korte voortbewegingen (Pierce-Shimomura *et al.*, 1999). De analyse maakt dus geen onderscheid tussen *reversal* en *omega bend* en dankzij een *Min Run Duration* van standaard 6 seconden is de module in staat kort onderbroken omkeringen als één enkele pirouette te identificeren.
- *Reversal Identification*: Dankzij een drempelwaarde van doorgaans 150°/seconde worden *reversals* geïdentificeerd.
- *Paralysis Analysis*: Paralyse wordt nagegaan door de snelheidsmetingen van elke track aan een drempelwaarde te onderwerpen. Wanneer de fractie van de snelheden beneden de *Speed Threshold* hoger is dan de *Min Fraction of Track Below Speed Threshold*, wordt de track als geparalyseerd beschouwd. Om met variërende tracklengtes rekening te houden, deelt de *Fraction of Paralyzed Worms* functie de totale tijdsduur van paralyse-tracks door de totale tijdsduur van alle tracks in het

experiment. Aanklikken van *Write Results to Excel File* maakt een Excel document aan waarin enkel de resultaten van de paralyse analyse staan.

- Via het *Plot Speeds Histograms* paneel kan men de weergave-opties van de histogrammen aanpassen: *Bin Spacing* is de waarde tussen twee datapunten en *Max Bin* is de maximale waarde van een datapunt.
- *General Preferences*: De *Fast Forward Speed* parameter geeft de snelheid weer waarbij de tracks in de WormAnalyzer worden afgespeeld. De standaard 6 factor duidt aan dat de opname zes maal sneller dan het originele .avi bestand wordt afgespeeld. De *Default Directory* option geeft de map weer waar de analyse-module tracks zal gaan zoeken en waar de analyse-resultaten worden opgeslagen. Ook hier moet de padnaam met een backslash worden aangevuld.

4.5 RNA interferentie (RNAi) screen

RNAi is een endogeen cellulair proces resulterend in gen *silencing* waarin *messenger* RNA moleculen (mRNA) voor degradatie getarget worden door dubbelstrengs RNA met complementaire sequentie (Fire *et al.*, 1998). dsRNA wordt na opname tot kleine fragmenten, *short interfering* RNAs (siRNAs), verwerkt waarvan de sequentie door de cellulaire machinerie aangewend wordt om homologe mRNAs en nascente transcripten voor respectievelijk post-transcriptionele gen *silencing* (PTGS) en transcriptionele gen *silencing* (TGS) te targetten (Chekulaeva en Filipowicz, 2009; Moazed, 2009). Bij *C. elegans* is RNAi buitengewoon doeltreffend mede doordat dsRNA tussen cellen en weefsels kan worden uitgewisseld en *RNA directed* RNA polymerase (RdRP) de siRNAs amplificeert (Winston *et al.*, 2002, Grishok, 2005). Na deze amplificatiestap accumuleren secundaire siRNA's enkel in weefsels waar het getargette gen tot expressie wordt gebracht. Er kan bij de worm dan ook een duidelijk onderscheid worden gemaakt tussen systemische en cel autonome RNAi. Systemische RNAi doelt op het uitwisselen van de initiële RNAi *trigger*, het dsRNA, over het volledige organisme, terwijl cel-autonome RNAi gelimiteerd is tot de cellen (en hun nakomelingen) die rechtstreeks in contact staan met het dsRNA (Jose en Hunter, 2007).

In de worm zijn verscheidene methoden voor RNAi inductie beschikbaar, maar vaak wordt door de beschikbaarheid van bibliotheken, de lage kost en het gemak van uitvoering de voorkeur gegeven aan *feeding* screenings. Wel is de eigenlijke dosis dsRNA waaraan individuele cellen worden blootgesteld bij deze methode kleiner in vergelijking met bijvoorbeeld dsRNA microinjectie. Tegelijkertijd vereenvoudigen de lagere dosissen het targetten van genen die vitaal zijn voor groei, vruchtbaarheid of levensvatbaarheid. Een bijkomend nadeel van *feeding* RNAi is dat bepaalde weefsels anders op RNAi triggers reageren, wat het bestuderen van sommige weefsels door RNAi bemoeilijkt (Calixto *et al.*, 2010).

4.5.1 Feeding RNAi screening

Feeding RNAi wordt uitgevoerd door de wormen te voederen met een bacteriële lijn die dsRNA corresponderend met het te targetten transcript tot expressie brengt. Op deze manier wordt een systemisch RNAi effect bekomen (Timmons *et al.*, 2001). Commercieel zijn twee RNAi *feeding* bibliotheken beschikbaar. Zo werd de Ahringer bibliotheek opgesteld door genomische DNA fragmenten tussen twee tegengesteld georiënteerde T7 promotors van de L4440 vector te kloneren (Timmons en Fire, 1998). Voor de Vidal bibliotheek werden intacte *open reading frames* (ORF) met behulp van Gateway klonering in diezelfde L4440 vector ingevoegd. Beide collecties gebruiken dan ook de HT115 bacteriële lijn als gastheer voor het plasmide construct. In dergelijke *E. coli* bacteriën wordt de expressie van het bacteriofaag T7 RNA polymerase geïnduceerd door IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactoside), waarna het polymerase vanaf de T7 promotorplaatsen *sense* en *antisense* RNA strengen synthetiseert die tot receptor dsRNA hybridiseren. HT115 cellen hebben voorts nog een defectief RNase III gen, gemarkeerd door een tetracycline-resistentie gen. De L4440 vector bevat overigens nog een ampicilline resistentie gen waardoor positieve selectie van correct getransformeerde HT115 cellen mogelijk is. De Ahringer en Vidal bibliotheken zijn deels overlappend, en samen in staat 94% van de individuele *C. elegans* genen te targetten (Kamath *et al.*, 2003; Rual *et al.*, 2004).

4.5.2 RNAi setup

In dit experiment bouwt men een negatieve en positieve controle in waarmee het fenotype van de teststalen vergeleken wordt. Zo doet de L4440 vector zonder *insert* steeds dienst als negatieve controle. Om snel visueel na te gaan of de RNAi reacties zijn opgegaan, wordt ook de L4440/*unc-22* vector gebruikt. Het *unc-22* gen codeert voor een groot intracellulair eiwit dat verantwoordelijk is voor het in stand houden van de normale spiermorfologie. Knockdown van dit gen resulteert in een duidelijk *twitching* fenotype; de wormen zijn niet alleen kleiner, maar maken ook continu schokkende bewegingen. Dit fenotype is te zien op Video 7.

Materiaal:

- NGM plaatjes waarbij fungizone, nystatine en ampicilline werden toegevoegd.
- isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG, Sigma-Aldrich)
- RNAi clones: HT115 bacteriën met RNAi vector L4440 + *insert*
- Ampicillin sodium salt (Sigma-Aldrich)

Methode:

- Bacteriële RNAi klonen worden overnacht opgegroeid in LB medium met ampicilline aan een eindconcentratie van 50 ng/mL.
- Van deze bacteriële suspensie kan men vervolgens 250 μ L overbrengen op een NGM plaat met ampicilline. Met het oog op de latere initiatie van de dsRNA-productie, is het aangewezen de bacteriën niet over de volledige plaat uit te smeren.

- De plaatjes laat men twee a drie dagen bij kamertemperatuur drogen zodat een dikke laag bacteriën kan groeien.
- dsRNA-productie induceert men door 250 μL 100 mM IPTG gesupplementeerd met ATR aan een eindconcentratie van 300 μM zorgvuldig op de bacteriële laag te pipetteren.
- Ongeveer 50-100 eitjes kunnen na *bleaching* van gravide wormen op de RNAi plaatjes gepipetteerd worden waarna de wormen in het donker bij 20°C tot volwassen individuen worden opgegroeid.

4.6 Confocale microscopie

De expressiepatronen van *yellow fluorescent protein* (YFP) en mCherry proteïnes in de transgenen worden door een Olympus Fluoview FV1000 (IX81) confocale microscoop gevisualiseerd.

Materiaal en methode:

- Een suspensie van 2% agarose (Sigma-Aldrich, w/v in gedemineraliseerd water) wordt in een microgolfoven verwarmd totdat alle partikels opgelost zijn. Om stollen te vermijden, wordt de oplossing tijdens het experiment in kleine epjes in een verwarmblok bewaard.
- 40 μL warme agarose oplossing wordt op een vers objectglaasje gepipetteerd, waarna snel een tweede objectglaasje op de druppel plaatst wordt zodat deze egaal kan drogen.
- Na het verwijderen van het tweede objectglaasje worden individuele wormen tot op de agar *gepickt* of plaatjes met M9 afgespoeld, wormen in een epje verzameld en na bezinking in een klein volume ($\pm 3 \mu\text{L}$) overgepipetteerd.
- Wormen worden vervolgens met 30 mM natriumazide (NaN_3 , Sigma-Aldrich, in M9) geïmmobiliseerd door 5 μL op het preparaat te pipeteren.
- Na het aanbrengen van een dekglasje wanneer de wormen gedroogd (maar nog steeds vochtig) zijn, wordt het preparaat gemonteerd in de confocale microscoop.

YFP en mCherry werden geëxciteerd bij respectievelijk 488 nm (argon laser) en 543 nm (helium-neon laser) en de fluorescente emissie werd gemeten met behulp van BA 505-525 (*barrier*) en LP560 (*longpass*) filters.

Voor kwantificering van YFP fluorescentie in de ASH neuronen werden de instellingen per reeks optische secties (Z-stack) constant gehouden:

- YFP excitatie met Argon 488 nm laser aan 20%
- YFP fluorescente emissie via filter BA 505-525
- 60x olie-immersie lens

- 750 HV (*high voltage*) intensiteit van de fotomultiplicator (de voltage van de *photomultiplier tube*, PMT, bepaalt het aantal vrijgezette elektronen wanneer een foton op de detector invalt). De *gain*, die het PMT signaal digitaal amplificeert, werd uitgezet door de waarde op 1 in te stellen.
- Scansnelheid 4 $\mu\text{s}/\text{pixel}$, Kalman accumulatie 6 (de opname wordt hierdoor zes maal herhaald en het finale beeld is een gemiddelde van alle opnames. Ruis wordt hierdoor uitgemiddeld en oneffenheden gereduceerd). Resolutie 1024x1024 pixels.
- Voor optische secties van ASH neuronen werd telkens een 0,2 μm *StepSize* gebruikt.

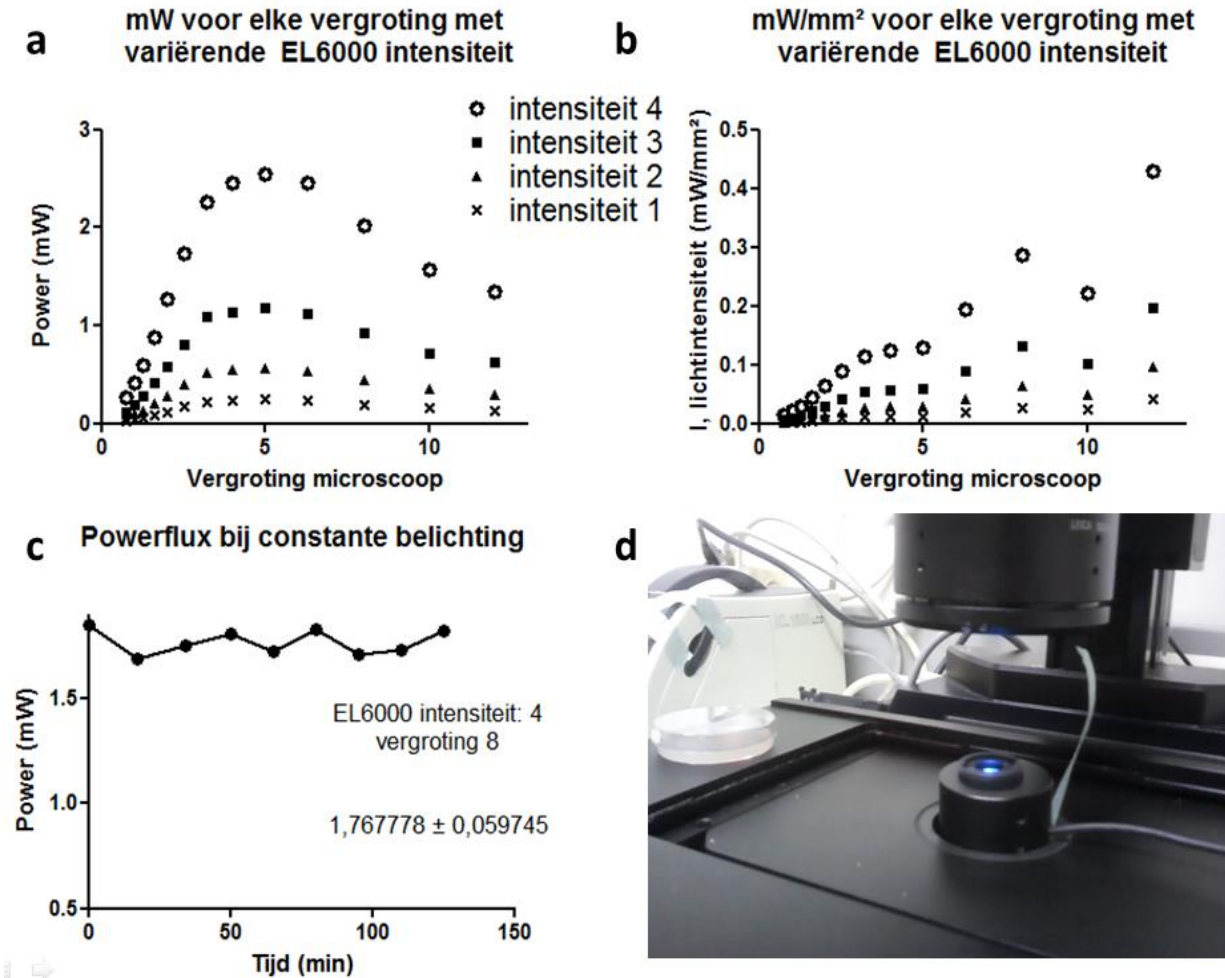
Confocale Z-stack projecties werden vervolgens met behulp van Imaris 7.2 (Olympus) in 3D gevisualiseerd. Via het *snapshot* commando kan Imaris de 3D data vanuit gewenste hoek tot een 2D afbeelding projecteren. Via ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) worden bepaalde parameters, zoals fluorescentie-intensiteit, uit deze afbeelding gekwantificeerd. De *corrected total cell fluorescence* ($CTCF = \text{Integrated Density} - (\text{oppervlakte van geselecteerde cel} \times \text{Mean fluorescence of background readings})$) werd berekend voor de ASH neuronen.

5 Resultaten

5.1 Optimalisatie en karakterisatie van het optogenetisch gedragsplatform

5.1.1 Lichtintensiteit van de externe EL6000 lichtbron voor fluorescentie

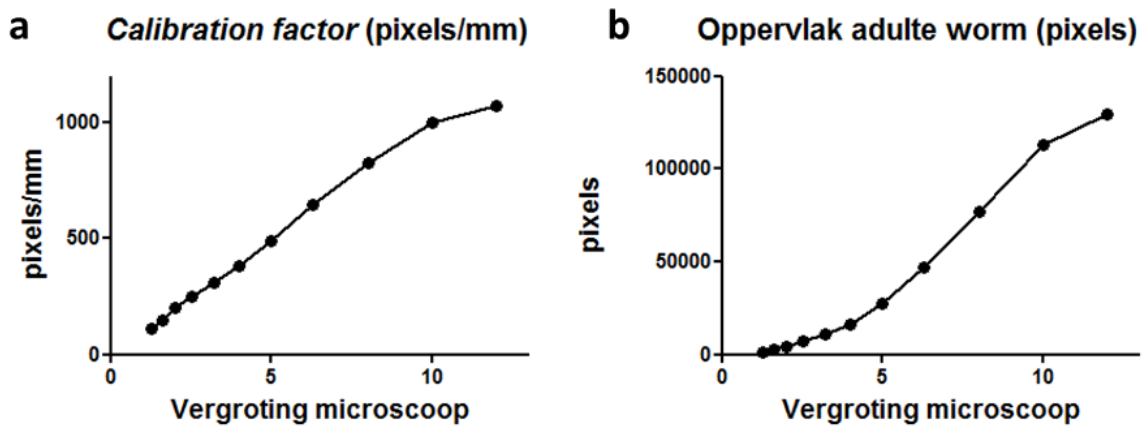
Een constante lichtintensiteit van de lichtpulsen is cruciaal voor reproduceerbare optogenetische gedragsstudies. Daarom moet eerst het lichtintensiteitsprofiel van de gebruikte apparatuur gekarakteriseerd worden. Om dit te doen werden de glazen plaat en de *neutral density* filter van de objecttafel verwijderd. Door vervolgens de reflectiespiegel weg te schuiven, kan de sensor van de optische power meter in de microscoopvoet geplaatst worden zodat de fotocel zich ongeveer op dezelfde hoogte als de testplaatjes bevindt (figuur 10d). Om lichtintensiteiten bij 470 nm te meten, gebruikt men een Thorlabs PM100D Handheld Digital Power Meter Console gekoppeld aan een S140C sensor. Lichtintensiteiten, weergegeven in milliWatt (mW), werden voor elke vergroting nadien naar mW per mm^2 geconverteerd. Op onderstaande figuur 10b is duidelijk te zien hoe de mW/mm^2 waardes voor magnitudes 5 en 10 van de lineariteit afwijken. Deze magnitudes werden om deze reden later niet bij optogenetische gedragsstudies gebruikt.



Figuur 10: (a, b) Power en lichtintensiteit metingen van de EL6000 externe lichtbron voor fluorescentie. (c) Powerflux bij constante belichting. Gemiddelde \pm standaarddeviatie (SD). (d) Voor metingen werd de sensor op gelijke hoogte met de *C. elegans* plaatjes gebracht door zowel de glazen plaat als de *neutral density* filter van de objecttafel te verwijderen.

5.1.2 Calibration Factor voor het tracking-proces

De verhouding tussen de wormdimensies en het overeenkomstige aantal pixels op de videobeelden is van groot belang voor het instellen van de *tracking*-parameters en de snelheidsbepalingen. Deze ratio werd afgeleid door afbeeldingen te maken van een Bürker telkamer op de objecttafel. Aangezien elke kamer in 16 vierkantjes met zijdes van 0.2 mm wordt onderverdeeld, kan men uit de *real-time* 640x480 *grayscale* videobeelden de *Calibration Factor* (pixels/mm) benodigd voor de WormAnalyzer bepalen (figuur 11a). Ook kan men via deze factor een schatting maken van de totale wormoppervlakte in pixels. Dit is handig bij het afstemmen van de *Max/Min single worm area* parameters. Jong adulte wormen zijn gemiddeld 1,1 mm lang (Byerly *et al.*, 1976).



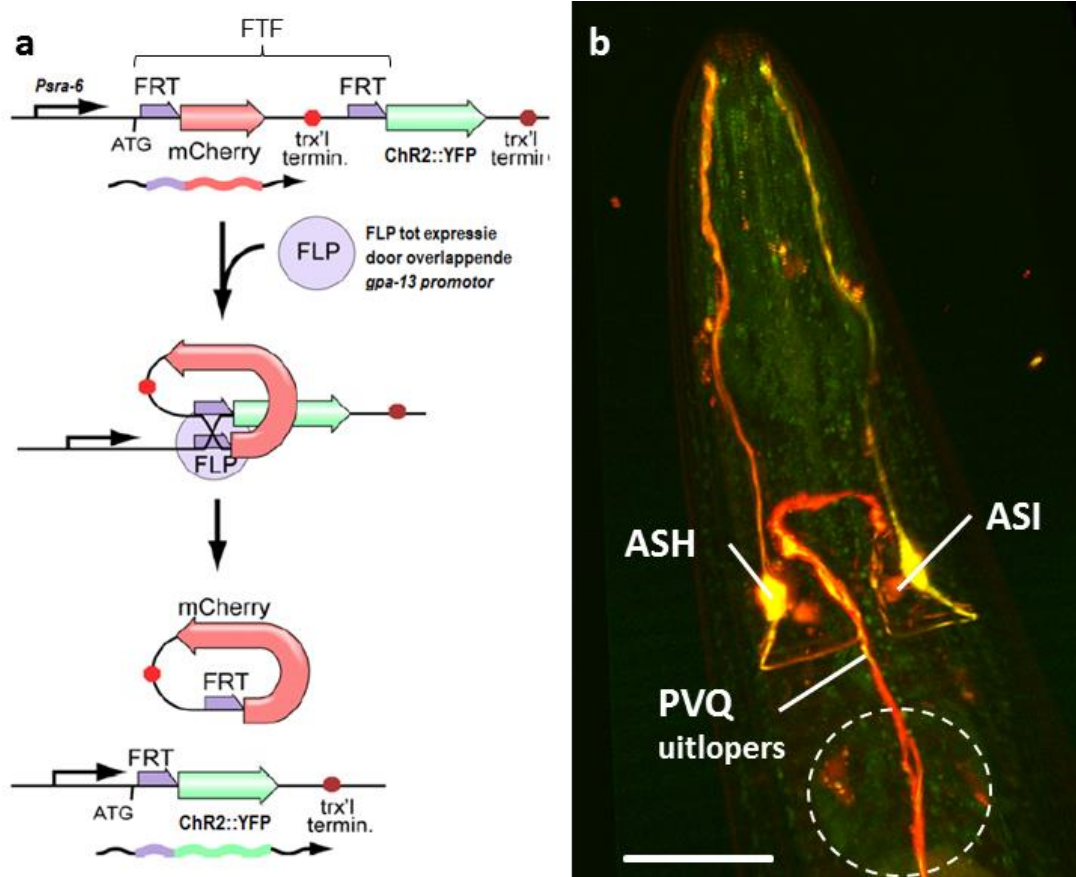
Figuur 11: (a) De *Calibration factor* (pixels/mm) wordt door de OptoTracker software gebruikt voor snelheidsbepalingen van individuele wormen. (b) Een schatting van de totale wormoppervlakte in pixels is handig bij het afstellen van de *tracking*-parameters per experimentele conditie.

5.2 Pilootstudie

5.2.1 Celspecifieke ChR2 expressie in het ASH neuronenaar

Een eerdere studie maakte gebruik van een *C. elegans* lijn die een ChR2 onder de controle van de *sra-6* promotor tot expressie brengt (Husson *et al.*, 2012a). Deze specifieke promotor drijft de expressie aan in amphide sensorische neuronen (ASH en ASI) en PVQ interneuronen van hermafrodieten (Troemel *et al.*, 1995). Om volledig uit te sluiten dat ASI en PVQ een bijdrage leveren aan de gedragsrespons na fotostimulatie, is er echter nood aan een celspecifieke ChR2-expressie in de ASH nociceptor. Dergelijke lijn (AQ2235 *lite-1(ce314); ljl5114[Pgpa-13::FLPase, Psra-6::FTF::ChR2::YFP]*) werd ontwikkeld door gebruik te maken van twee promotoren met een overlappend expressiedomein die een *flippase* (FLP) recombinase systeem aandrijven (Ezcurra *et al.*, 2011). In transgene cellen controleert de hierboven beschreven *Psra-6* promotor de transcriptie van een YFP-gelinkte ChR2 coderende sequentie, voorafgegaan door een "off cassette". Deze door FTF gesymboliseerde cassette wordt geflankeerd door twee *flippase recognition target* (FTR) sequenties en omvat een mCherry coderende sequentie nagevolgd door de 3'-UTR van het *let-858* gen. De 3'-UTR zal niet alleen het poly-adenylatie signaal voor het mCherry mRNA verschaffen, maar een ingebedde transcriptie terminatie sequentie zorgt er tegelijkertijd voor dat de downstream coderende regio niet tot expressie wordt gebracht. Het FLP enzyme, aangedreven door de *gpa-13* promotor, zal een sequentie-specifieke recombinatie katalyseren waardoor de FTF cassette als circulair DNA molecule wordt verwijderd. Door deze sequentie-specifieke recombinatie wordt de ChR2::YFP coderende regio onder de controle van de *sra-6* promotor gebracht en wordt het fusieconstruct geproduceerd. Het overlappende expressie domein van de *Pgpa-13/Psra-6* promotorcombinatie zorgt in AQ2235 individuen voor ChR2::YFP expressie en dit uitsluitend in het polymodale

sensorische ASH neuronenpaar. Een conceptueel overzicht van deze conditionele expressie, alsook confocale secties van de hoofdregio van een AQ2235 worm waarbij YFP-fluorescentie de ASH neuronen doen oplichten, is weergegeven in figuur 12. Een 3D animatie van deze *Z-stack* is te zien in Video 2 op bijgeleverde cd.

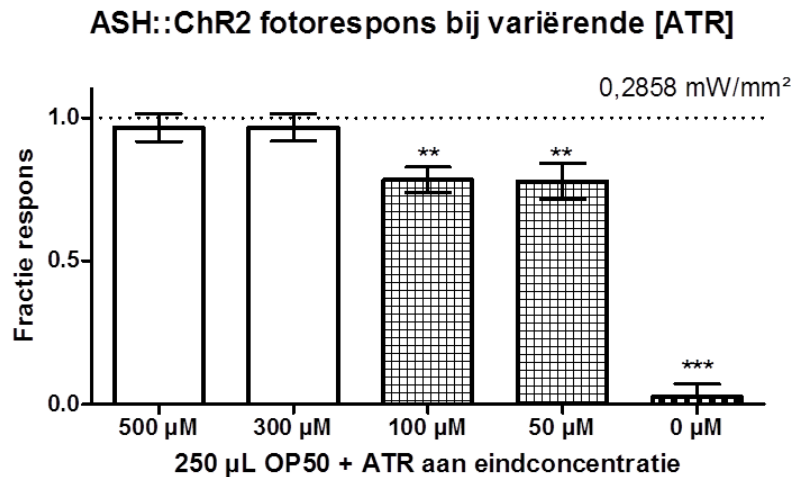


Figuur 12: Strategie voor ASH-specifieke Chr2 expressie. (a) Een FLP induceerbaar transgen zal in de “off” configuratie mCherry onder controle van de *sra-6* promotor tot expressie brengen. Door de werking van een *let-858* transcriptie terminator (*trx'1 termin.*) worden stroomafwaartse sequenties echter niet afgeschreven. FLP expressie resulteert in excisie van het mCherry::*let-858* fragment waardoor de ORF van het Chr2::YFP fusiegen rechtstreeks onder controle van de *sra-6* promotor komt te staan. Figuur aangepast van Davis *et al.* (2008). FTR, *flippase recognition target*; FTF, FRT::mCherry::*let-858* 3' Terminator::FRT. (b) Confocale *imaging* (*Z-stack*) van de hoofdregio van AQ2235 wormen: Chr2::YFP expressie in ASH neuronen (geel), mCherry expressie in ASI en PVQ (rood). De gestippelde cirkel geeft de locatie van de *terminal bulb* in de farynx weer. Schaalbalk van 30 μm .

5.2.2 Optimale *all-trans* retinal (ATR) concentraties

Om de optimale *all-trans* retinal (ATR) concentratie te bepalen die aan de OP50 voedingsbron moet worden gevoegd, werden AQ2235 wormen op gezaaide plaatjes met variërende ATR concentraties opgegroeid. De fotorespons van adulte (doorgaans gravide) wormen werd manueel nagegaan door de fractie reagerende wormen te kwantificeren. Enkel wormen die zich vooruit bewegen werden belicht waarna reactie toegekend werd aan zowel uitgelokte *stop* als *reversal*. In onderstaande grafiek werden per plaat telkens 10 vooruit bewegende wormen met blauw licht (460-500 nm) van 0,2858 mW/mm² gestimuleerd, en dit voor minstens 10 plaatjes herhaald (figuur 13). Aangezien de piek instroom van Chr2 kan

variëren bij langdurige en herhaalde stimulatie, werden wormen telkens eenmalig belicht (Liewald *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2009). Dieren opgegroeid zonder de ChR2 cofactor vertoonden onbeduidende responsen. Gelijkaardige gedragstesten met andere lichtintensiteiten gaven vergelijkbare resultaten. Voor verdere experimenten werd telkens ATR aan een eindconcentratie van 300 μM , aan 250 μL OP50 *E. coli* suspensie gesupplementeerd.



Figuur 13: ASH::ChR2 fotorespons bij variërende [ATR]. Adulte transgene wormen met ASH-specifieke ChR2 expressie werden manueel met blauw licht beschenen (460-500 nm, 0,2858 mW/mm²) waarna de fractie reagerende wormen bepaald werd. Per test werden 10 individuele wormen belicht, en de test werd meermaals met andere wormen herhaald ($n \geq 10$). Balkjes geven de SD weer; ANOVA met een Tukey *post-hoc* test; n.s. niet significant, *** $p < 0,0001$, ** $p < 0,005$, * $p < 0,05$.

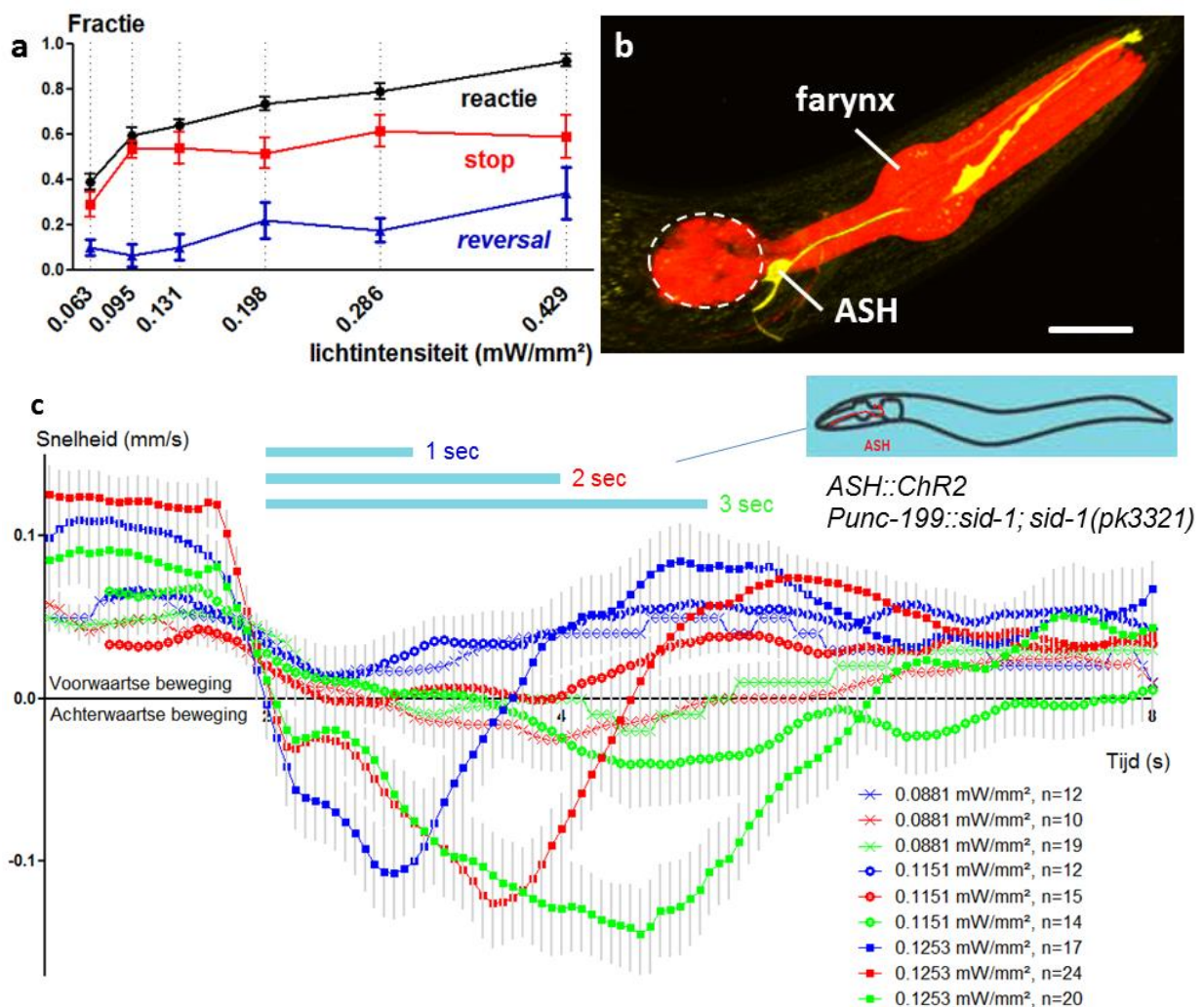
5.2.3 RNAi hypergevoelige lijn met ASH-specifieke expressie van ChR2

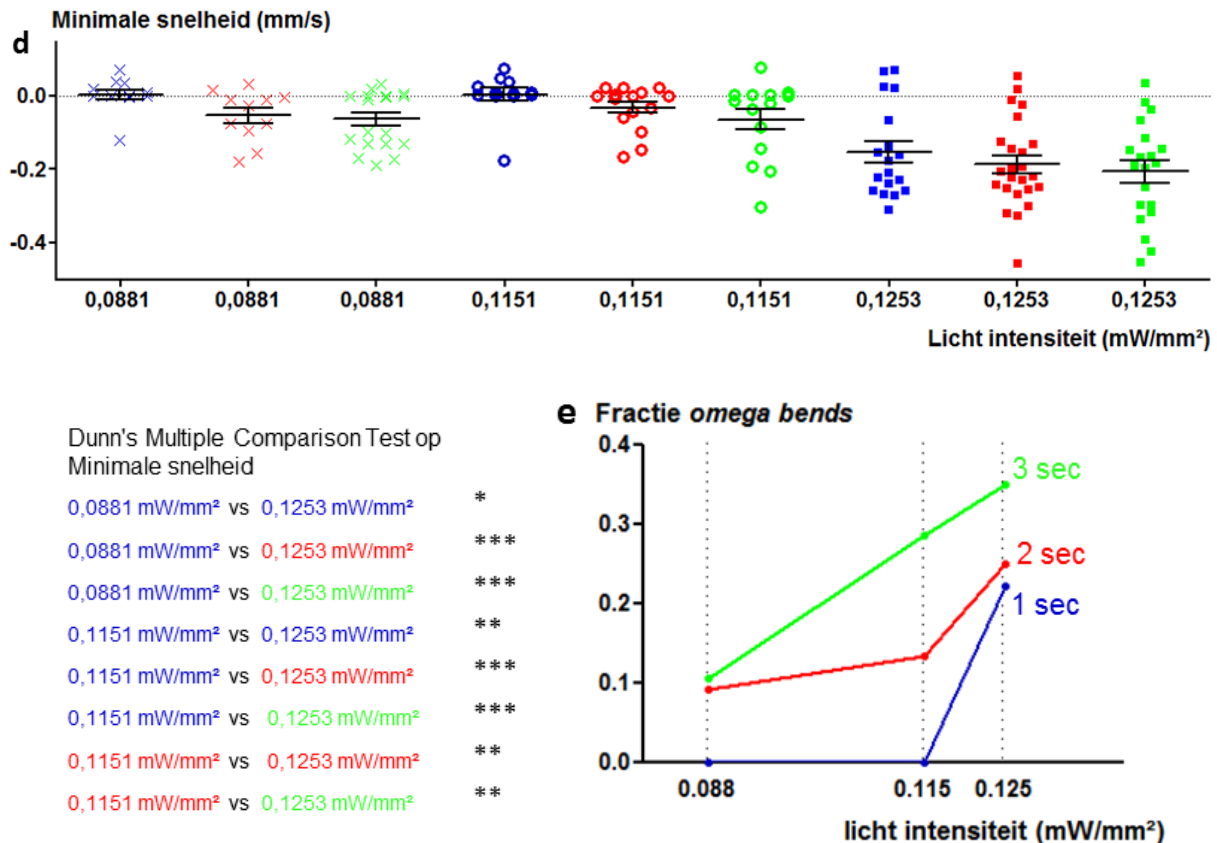
Om efficiënt neuronale transcripten neer te reguleren om later cel-autonome spelers in het outputgedrag van de ASH nociceptor te identificeren, werd *sid-1* pan-neuronaal tot expressie gebracht. Dit deden we door AQ2235 met de gesensitizeerde TU3401 lijn te kruisen. Het endogene *sid-1* allel van TU3401 (*sid-1(pk3321) V; uls69 [pCFJ90(Pmyo-2::mCherry) + Punc-119::sid-1] V*) bezit een *missense* puntmutatie waardoor het niet langer functioneel is. Vanop een geïntegreerde array wordt een functioneel *sid-1* gen pan-neuronaal tot expressie gebracht, terwijl de *myo-2* promotor mCherry productie aandrijft in de faryngale spieren. Bij deze kruising wordt niet op het disfunctionele *lite-1(ce314)* allel geselecteerd, waardoor deze waarschijnlijk verloren gaat.

5.2.4 Optogenetische karakterisatie van *sid-1*;ASH::ChR2

De neuronale *sid-1* expressielijn, gemakshalve aangeduid als *sid-1*;ASH::ChR2, werd eerst optogenetisch gekarakteriseerd. In een eerste fase werden wormen manueel met blauw licht van variërende lichtintensiteit belicht, waarna de fractie stoppende en omkerende individuen werd bepaald. De fractie reagerende wormen is dan de som van beide, en is samen met overige fracties in figuur 14a tegen de lichtintensiteiten uitgezet. Zoals verwacht vertoonden

transgene wormen na belichting doorgaans een respons, en steeg de kans op omkering bij toenemende lichtintensiteit. Met behulp van de OptoTracker werd het optogenetisch-geïnduceerd gedrag vervolgens gekwantificeerd (figuur 14 c, d en e). Wormen werden op ATR plaatjes tot adult (doorgaans gravid) opgegroeid, waarna ze tenminste 30 minuten vóór de gedragsanalyse *gepicked* werden op nieuwe NGM plaatjes, gezaaid met een dunne, egale OP50 laag. Hiervoor werden plaatjes kort overnacht opgegroeid zodat de kop van de wormen tijdens het kruipen niet onder de bacterielaag zou verdwijnen. Voor de illuminatie varieerden we zowel lichtintensiteit als duur van de lichtpuls. Analyse van de filmpjes gebeurde met de OptoTracker software en de snelheid (*Velocity* [mm/s]) werd over twee opeenvolgende *frames* berekend. Videofragmenten 4 en 5 tonen de respons na ASH-fotoactivatie bij blauw licht beschijning met twee lichtintensiteiten. De snelheidsprofielen van alle gemeten wormen (ook deze die niet reageerden) kunnen daarna per conditie gebundeld worden. Een eenvoudige parameter die men uit individuele snelheidsprofielen kan extraheren, is de maximale achterwaartse snelheid na illuminatie (minimale snelheid). Aangezien deze waardes doorgaans geen normaalverdeling volgen, worden statistische verschillen nagegaan met een non-parametrische Kruskal-Wallis test en een Dunn *post-hoc* toets.





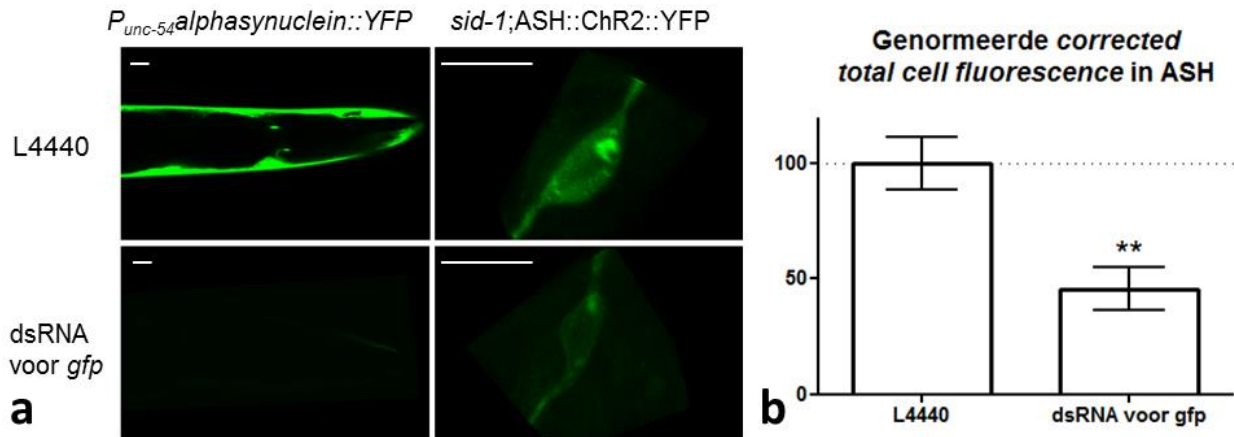
Figuur 14: Optogenetische karakterisatie van *sid-1*;ASH::ChR2. (a) De kans op het voorkomen van een stop of *reversal* na fotostimulatie (460-500 nm) werd voor elke lichtintensiteit geplot. De fractie reagerende wormen is de som van beide. De foutbalken geven de SD weer. (b) Confocale Z-projectie van de hoofdregio van *sid-1*;ASH::ChR2 wormen. Het ASH neuronparenpaar licht door YFP fluorescentie geel op, terwijl mCherry expressie de faryngale spieren rood kleurt. De gestippelde cirkel geeft de locatie van de *terminal bulb* in de farynx weer. Schaalbalk van 20 μm . (c) Transgene wormen werden met blauw licht (460-500 nm) met variërende lichtintensiteit voor 1, 2 en 3 s belicht. Filmpjes werden met de OptoTracker verwerkt om de snelheid van individuele wormen te bekomen, dit berekend over twee opeenvolgende *frames*. Gemiddelde snelheden zijn tegen de tijd uitgezet en grijze balkjes stellen de *standard error of mean* (SEM) waarden voor. (d) Minimale snelheid (hoogste snelheid bij achterwaartse voortbeweging) werd voor elk individu geplot, waarna statistische verschillen met een Kruskal-Wallis test gevolgd door een Dunn *post-hoc* test werden nagegaan (***) $p < 0,0001$, **) $p < 0,005$, *) $p < 0,05$. (e) De fractie uitgelokte *omega* bends bij illuminatie met variërende lichtintensiteit en pulsduur voor de optogenetische karakterisatie met de OptoTracker.

5.3 Functionele RNAi-optogenetica screening

5.3.1 Efficiëntie van neuronale RNAi

De *yfp* coderende sequentie verschilt van deze van *gfp* in slechts acht nucleotiden, wat zich in een verschil van vijf aminozuren tussen GFP en YFP vertaalt. Deze minieme verschillen maken het mogelijk het *yfp* transcript met *gfp*-dsRNA voor afbraak te targetten (Calixto *et al.*, 2010). De efficiëntie van neuronale transcript knockdown werd specifiek getest door bacteriën die dsRNA voor *gfp* produceren aan *sid-1*;ASH::ChR2 wormen te voeren. CTCF waarden werden vergeleken met deze van wormen gevoed met bacteriën die de lege L4440 RNAi vector bezitten ($\text{CTCF} = \text{Integrated Density} - (\text{oppervlakte van geselecteerde cel} \times \text{Mean fluorescence of background readings})$). We maakten hiervoor per experimentele worm

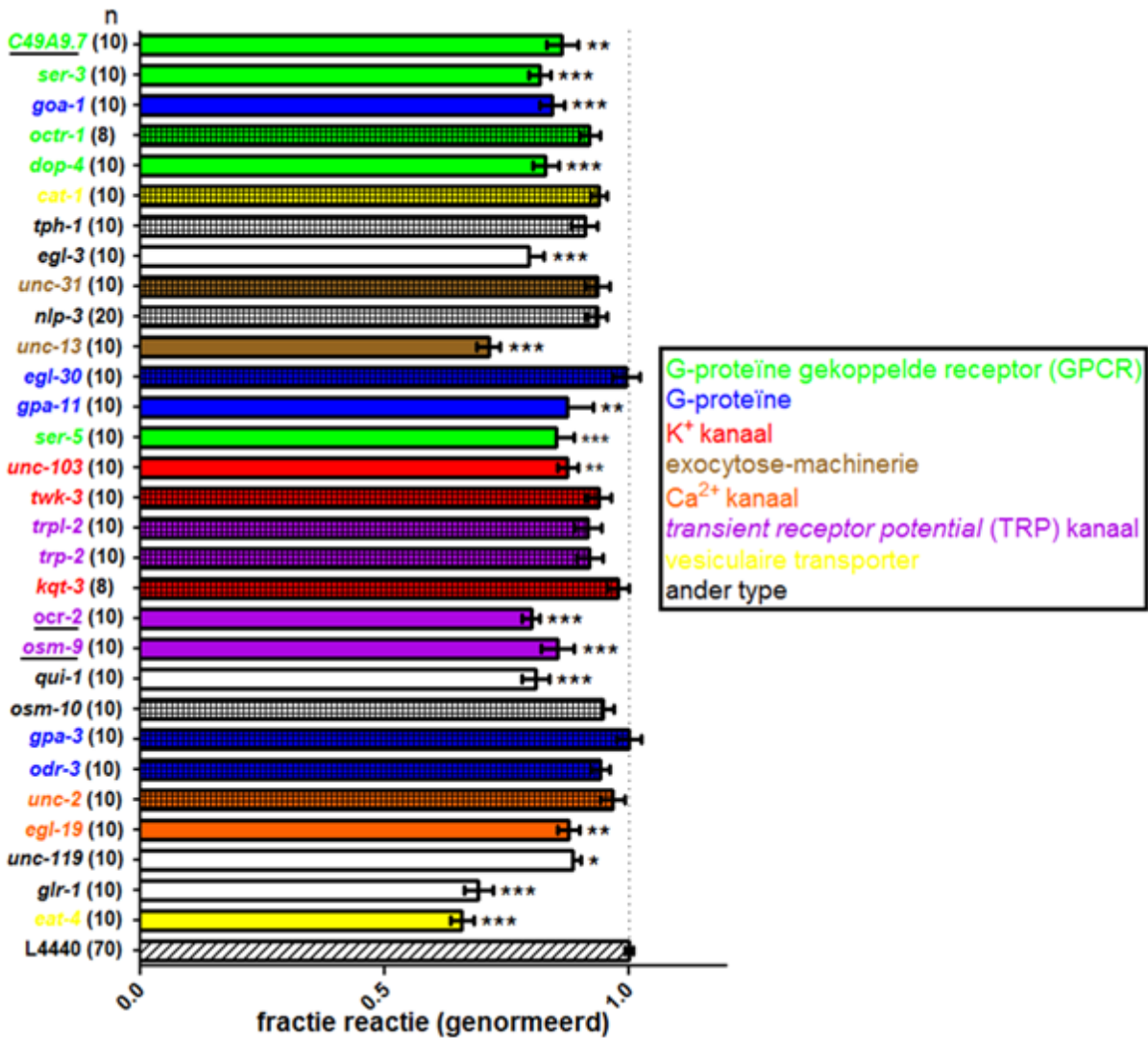
een *Z-stack* van het helderste ASH neuron, waarna de 2D projecties van de optische secties in ImageJ werden gekwantificeerd. Als eenvoudige visuele controle werden ook wormen die *yfp* uitsluitend in de spieren tot expressie brengen (NL5901, *pkIs2386[Punc-54::alphasynuclein::YFP]*) met *gfp*-dsRNA producerende bacteriën en bacteriën met lege L4440 RNAi vector gevoed.



Figuur 15: Verificatie neuronale RNAi. (a) YFP fluorescentie intensiteit in de hoofdregio van wormen met spierspecifieke YFP expressie (*Punc-54::alphasynuclein::YFP*) en in het helderste ASH neuron van de gesensitiseerde lijn (*ASH::Chr2::YFP;Punc-199::sid-1;sid-1(pk3321)*) na opgroei op bacteriën die dsRNA voor *gfp* produceren en bacteriën die de lege L4440 vector bezitten (n=10). Schaalbalk van 10 μ m. **(b)** Genormeerde CTCF-waarde (*corrected total cell fluorescence*) van het helderste ASH neuron bij telkens 10 aparte wormen. Foutbalkjes stellen SD waarden voor; statistische verschillen met een t-test nagegaan; **p < 0,005.

5.3.2 Manuele RNAi-optogenetica screening

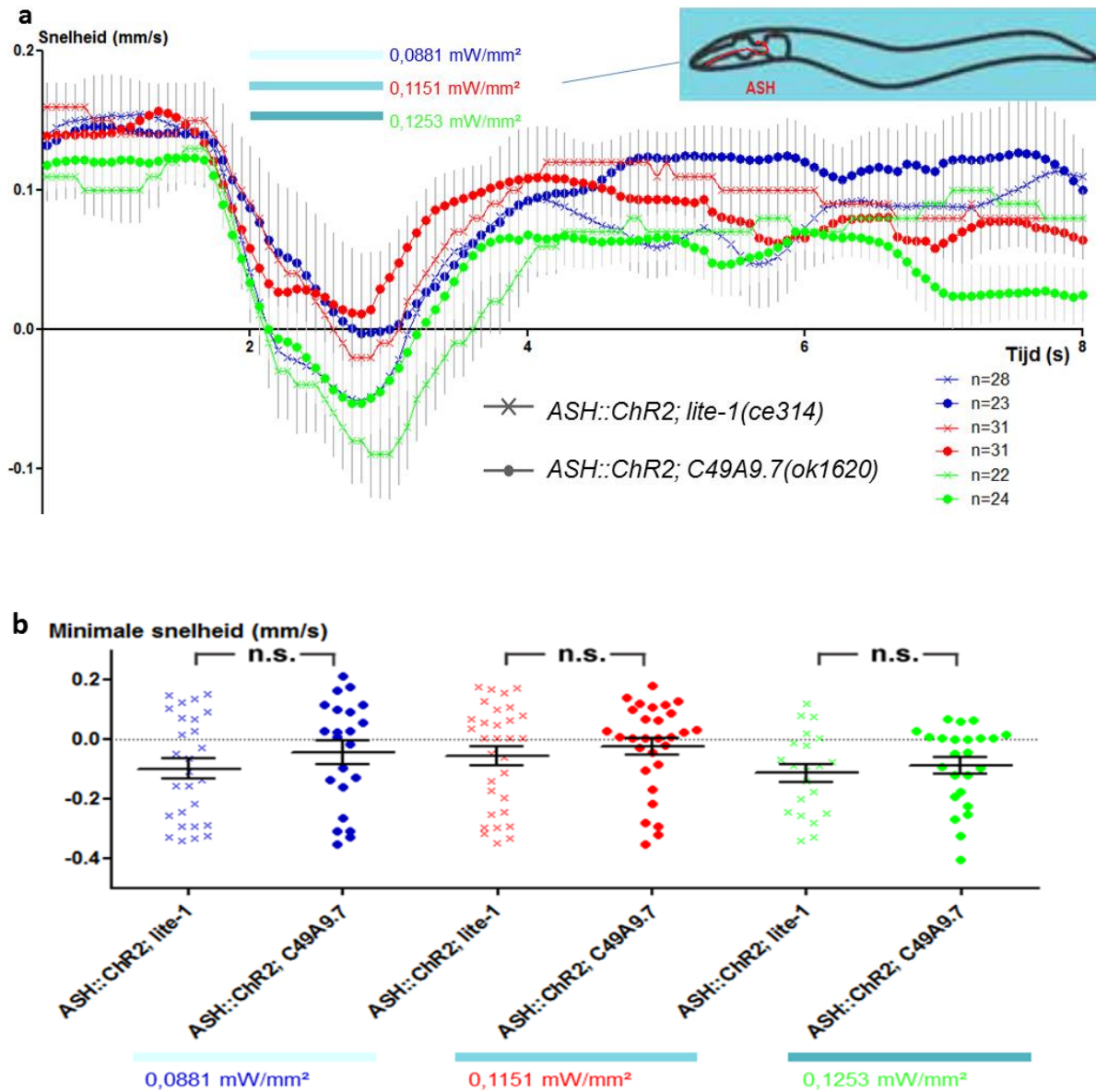
Voor de RNAi *feeding* screening werden kandidaat-genen met een vermoedelijke post-transductie signaleringsfunctie in ASH geselecteerd uitgaande van beschikbare literatuurgegevens. Voor elke bacteriële klonen werden telkens tien adulte (gemiddeld gravide) wormen op eenzelfde plaat manueel getest voor reactie na blauw licht beschijning (460-500 nm, 0,1977 mW/mm²). Wormen werden pas belicht wanneer deze in de bacteriebodem vooruit bewogen, waarna zowel de uitgelokte *stop* als *reversal* als reactie beschouwd werd. Elke test werd meermaals met andere individuen herhaald (n \geq 8). De fractie reagerende wormen werd genormeerd ten opzichte van de negatieve controle (wormen gevoed met bacteriën die lege L4440 RNAi vector bezitten) van diezelfde dag. Uiteindelijk werden de statistische verschillen in vergelijking met de L4440 testgroep door een ANOVA en Tukey *post-hoc* test bepaald. (**p < 0,0001, **p < 0,005, *p < 0,05).



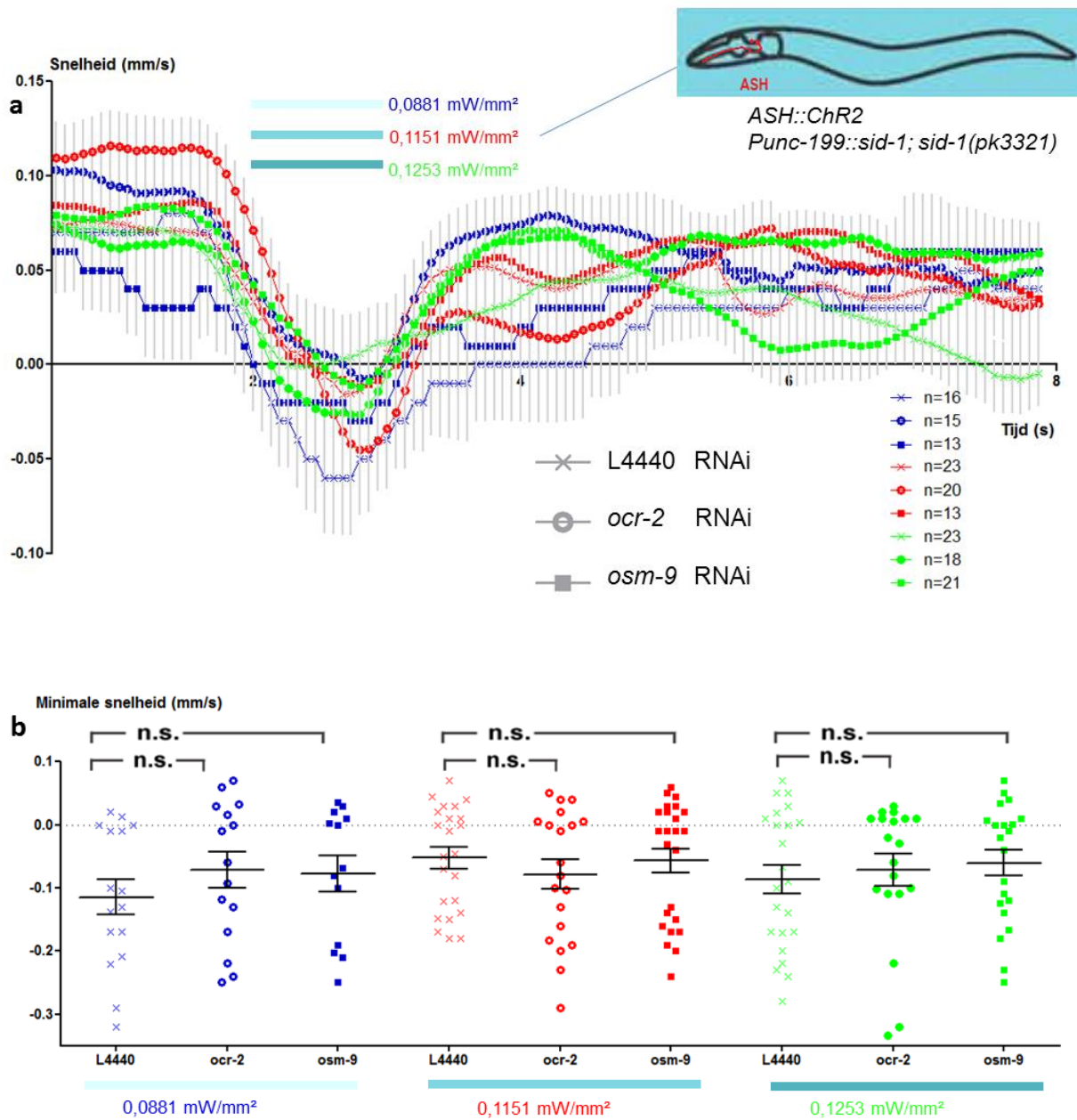
Figuur 16: Functionele RNAi-optogenetica screen voor de identificatie van essentiële factoren betrokken bij signaaltransductie, stroomafwaarts van de primaire sensorische proteïnen in het ASH neuron. Voor elke knockdown lijn werden 10 adulte wormen manueel voor hun fotorespons na blauw-licht illuminatie getest (460-500 nm, 0,1977 mW/mm²). Elke test werd meermaals met andere wormen herhaald (n ≥ 8) en de fractie reagerende individuen telkens met de negatieve controle van diezelfde dag genormeerd (wormen gevoed met de lege L4440 RNAi vector). Balkjes stellen SEM-waarden voor; ANOVA met een Tukey *post-hoc* test; ***p < 0,0001, **p < 0,005, *p < 0,05. De genetranscripten die neergereguleerd worden voor elk construct, worden met een kleurencode in verschillende klassen onderverdeeld. In een vervolgetoets werd de fotorespons van transgene wormen met RNAi knockdown of genomische deletie van onderstreepte genen met de OptoTracker gekwantificeerd.

5.3.2 Tracking-experimenten

Voor verdere validatie van de significante RNAi-hits werd de fotorespons van *sid-1;ASH::ChR2* wormen met *osm-9* en *ocr-2* knockdown gekwantificeerd met de OptoTracker. Ook werd een defectief *C49A9.7* allel in de oorspronkelijke AQ2235 ingekruist door AQ2235 met de *C49A9.7* deletiemutant RB1423 (*C49A9.7(ok1620)* IV) te kruisen. Voor de optogenetische gedragsanalyse werden adulte wormen minimaal 30 minuten voor de meting op ongezaaide NGM plaatjes gebracht.



Figuur 17: Tracking-experimenten voor de *ASH::ChR2; C49A9.7(ok1620)* lijn. Transgene wormen van de controle lijn (*ASH*-specifieke *ChR2* expressie, AQ2235) en deze met een deletie van het *C49A9.7* gen werden gedurende 1 s belicht. **(a)** Filmpjes werden met de OptoTracker verwerkt om de snelheid van individuele wormen te bekomen, dit berekend over twee opeenvolgende *frames*. Het gemiddelde snelheidsprofiel van het optogenetisch-geïnduceerd gedrag werd vervolgens per lijn en per gebruikte lichtintensiteit geplot (0.0881 mW/mm², 0.1151 mW/mm² en 0.1253 mW/mm²). Grijs staafjes stellen de SEM-waardes voor. **(b)** De minimale snelheden van de deletiemutant werden met deze van de controlelijn vergeleken door naargelang de verdeling een t-test of een Mann-Whitney-toets uit te voeren. (n.s., niet significant).



Figuur 18: Tracking-experimenten na knockdown van *osm-9* en *ocr-2*. Transgene wormen met ASH-specifieke ChR2 expressie en pan-neuronale *sid-1* expressie werden met bacteriën die dsRNA voor *osm-9* en *ocr-2* produceren gevoed. Als controle werden bacteriën gebruikt die een lege L4440 vector bezitten. Adulte wormen werden gedurende 1 s met licht van variërende intensiteit belicht (0,0881 mW/mm², 0,1151 mW/mm² en 0,1253 mW/mm²). **(a)** Filmpjes werden met de OptoTracker verwerkt om de snelheid van individuele wormen te bekomen, dit berekend over twee opeenvolgende frames. Het gemiddelde snelheidsprofiel van het optogenetisch-geïnduceerd gedrag werd vervolgens per lijn en per gebruikte lichtintensiteit geplot (0,0881 mW/mm², 0,1151 mW/mm² en 0,1253 mW/mm²). Grize balkjes stellen de SEM-waarden voor. **(b)** De minimale snelheden van individuele wormen werden vergeleken door een Kruskal-Wallis uit te voeren (n.s., niet significant).

6 Discussie

Optogenetische technieken stellen ons in staat op non-invasieve wijze de activiteit van individuele neuronen bidirectioneel en reversibel te controleren. Optogenetica vormt dan ook een krachtige methode om de functie van individuele neuronen binnen een neuronaal netwerk te bestuderen. Deze onderzoeksmethode heeft het veld van de neurobiologie grondig gerevolutioneerd (Deisseroth, 2011). Optogenetische technieken voor *C. elegans* neurobiologisch onderzoek werden dan ook onder supervisie van professor Husson in de onderzoeksgroep geïntroduceerd. Het proefschrift beoogt een nauwkeurige beschrijving van een eenvoudig optogenetisch gedragsplatform voor *whole-field* illuminatie van wormen en gedragsanalyse door middel van *video-tracking* technologie. In een eerste deel van deze masterproef werd deze OptoTracker gekarakteriseerd, waarna we in de pilotstudies de respons van transgene wormen met ASH-specifieke ChR2 expressie hebben gekwantificeerd. In een tweede luik werden via RNAi de transcripten van kandidaat-genen met vermoedelijke post-transductionele signaleringsfunctie in ASH neuronen neer gereguleerd, en het effect van deze knockdown op het gedrag na ASH fotostimulatie geanalyseerd. De resultaten van deze RNAi screening alsook vervolggexperimenten met genomische mutanten, worden in een apart deel bediscussieerd.

De OptoTracker vormt een eenvoudige opstelling voor de *whole-field* illuminatie van wormen. Eenmaal de belangrijkste parameters afgesteld zijn, is de software voor het instellen van computergestuurde lichtpulsjes en voor de analyse van filmpjes door de grafische gebruikersomgeving eenvoudig in gebruik. Tijdens het *tracking*-proces wordt de positie van de belichte worm aan de hand van zijn massacentrum opgevolgd. Hierdoor biedt de software enkel rudimentaire locomotorische informatie zoals voortbewegingsnelheid, en bovendien kan er moeilijk een onderscheid gemaakt worden tussen voor- en achterwaartse beweging (Ramot *et al.*, 2008). De snelheidsprofielen dienen daarom manueel in Excel geverifieerd te worden.

Zoals aangegeven in de inleiding, kan men bij celspecifieke expressie van een optogenetisch eiwit specifiek het cellulair gedrag van de doelcel(len) controleren door het volledige nematodenlichaam te beschijnen. Ook optogenetische proteïnes met gelijkaardige excitatiespectra kunnen op deze manier gelijktijdig gerekruteerd worden. Indien het gedragsplatform nog met een extra lichtbron uitgebreid wordt, bijvoorbeeld een LED-ring rond het microscoop objectief, kan men met de opstelling verschillende neuronen al dan niet gelijktijdig maar toch onafhankelijk van elkaar te activeren door er optogenetische eiwitten met goed onderscheiden spectrale eigenschappen te introduceren. Wanneer celspecifieke expressie niet mogelijk blijkt, is gerichte belichting van de lichaamsregio waar de doelcel zich bevindt wenselijk. Er werden reeds verschillende opstellingen beschreven in staat dit te

doen, waaronder één waarbij men per lichtbundel ook de intensiteit en golflengte kan variëren (Stirman *et al.*, 2011; Husson *et al.*, 2013a).

6.1 Pilootstudies: Optogenetische karakterisatie van *sid-1*;ASH::ChR2

In de eerste set experimenten werd de optimale *all-trans* retinal (ATR) concentratie bepaald die voor een optogenetisch experiment aan de OP50 voedingsbron moet worden toegevoegd. Dit deed men door transgene wormen met ASH-specifieke ChR2 expressie in voedingsbodems met variërende concentraties gesupplementeerd ATR op te laten groeien, om daaropvolgend de fractie reagerende wormen na manuele belichting met blauw licht te kwantificeren.

Vervolgens werden ASH::ChR2 wormen met pan-neuronale *sid-1* expressie en een disfunctioneel endogeen *sid-1* allel optogenetisch gekarakteriseerd met behulp van het optogenetisch gedragsplatform. Deze *tracking*-experimenten werden uitgevoerd na het transfereren van transgene wormen op vers gezaaide plaatjes. Voedsel heeft als voornaamste gedragsmodulator een aanzienlijk effect op de voortbeweging, waardoor wormen in de bacterielaag zich langzaam binnen een beperkt gebied verplaatsen (Fujiwara *et al.*, 2002). Af en toe schakelen wormen echter over naar een alternatieve gedragstoestand, en deze wordt gekenmerkt door snelle verplaatsing over grotere afstanden. Het voorkomen van verschillende voortbewegingssnelheden verklaart dan ook de variatie in snelheden vlak voor de belichting.

De gedragsrespons uitgelokt na *whole-field* illuminatie van transgene wormen met ASH-specifieke ChR2 expressie lijkt sterk op de vermijdingsrespons van *C. elegans* voor natuurlijke stimuli. Zoals in voorgaande studie bepaald, stijgt de kans op *reversal* en het uitvoeren van een *omega bend* bij toenemende lichtintensiteit (Husson *et al.*, 2012a). Ook bij langere lichtpulsen neemt de frequentie van *omega bends* toe, wat volgens het model van *graded* synaptische transmissie zich zou vertalen in de stijgende hoeveelheden vrijgezette neurotransmitter. Belangrijk te vermelden is dat gedragsexperimenten met de OptoTracker met relatief lage lichtintensiteit plaatsvinden in vergelijking met deze uitgevoerd met manuele belichting. Er moeten namelijk kleinere vergrotingen gebruikt worden om individuele wormen gedurende één opname in beeld te houden.

6.2 RNAi-optogenetica screening

Er werd reeds intensief onderzoek verricht naar de primaire transduciemoleculen van de polymodale ASH nociceptor, maar er is veel minder geweten over de intracellulaire modulatie en amplificatie van aversieve signalen. De RNAi screening tracht cel-autonome spelers in het outputgedrag van de ASH nociceptor te identificeren en werd zo ontworpen dat wormen na knockdown van factoren die stroomafwaarts van de primaire sensorische eiwitten functioneren, een verlaagde respons vertonen na ASH fotoactivatie.

6.2.1 Verificatie van neuronale RNAi

Bij *feeding* RNAi worden de dsRNA molecules door ingestie opgenomen en is het RNAi-effect volledig van systemische RNAi afhankelijk. In deze omstandigheden wordt het proces omgevings-RNAi genoemd. Naast intercellulaire uitwisseling van *silencing* signalen is de aanwezigheid van een gespecialiseerde dsRNA opname-machinerie hierbij noodzakelijk (Winston *et al.*, 2007). Zo zal het sterk geconserveerde transmembranaire SID-1 eiwit het intercellulair transport van dsRNA-*silencing* signalen bemiddelen. Het fungeert als dsRNA-geactiveerd kanaal voor passieve diffusie en is door deze activiteit bijgevolg vereist voor systemische RNAi (Shih en Hunter, 2011). De RNAi activiteit van *sid-1* mutanten is om die reden volledig cel-autonoom. SID-1 is aanwezig in alle cellen uitgezonderd deze van het zenuwstelsel, waar slechts een fractie van de neuronen expressie vertoont (Feinberg en Hunter, 2003). Hoewel zenuwcellen hierdoor amper gevoelig zijn voor geïnjecteerd of geïngesteerd dsRNA, zijn ze wel RNAi-competent aangezien neuronaal gecodeerd dsRNA wel neerregulatie van neuronale transcripten teweegbrengt (Kamath *et al.*, 2003). Pan-neuronale expressie van *sid-1* via de *unc-199* promotor zal de respons van het neuronale weefsel voor geïngesteerd dsRNA vergroten (Calixto *et al.*, 2010). De neuronale overexpressie van het *sid-1* gen veroorzaakt in tegenstelling tot de talrijke RNAi-stimulerende mutaties geen temperatuursgevoelige steriliteit of gereduceerd nakomelingschap (Boutros en Ahringer, 2008). Wel bestaat de kans dat deze manipulatie de specificiteit reduceert (Pavelec *et al.*, 2009). Neuronale *sid-1* expressie zal bovendien non-neuronale RNAi verzwakken, wat rijmt met het idee dat de hoeveelheid dsRNA beschikbaar voor het *silencen* van een gen beperkt is (Yigit *et al.*, 2006). Lokale neuronale overexpressie van *sid-1* zal dsRNA weg titreren, en dit is nuttig voor het bestuderen van neuronale fenotypes na neerregulatie van wijdverspreide genen of genen die beduidende pleiotropie of letaliteit vertonen.

Zoals beschreven, werd de efficiëntie van neuronale RNAi getest door een knockdown van ASH-specifieke *yfp* expressie. De gemiddelde CTCF waarde van het helderste ASH neuron van gesensitiseerde wormen opgegroeid op bacteriën die *gfp*-dsRNA produceren, ligt significant lager dan deze voor wormen gevoed met bacteriën die de lege L4440 vector bezitten. Wel is deze reductie in vergelijking met de NL5901 controle-lijn, waar spierspecifieke YFP productie na RNAi bijna volledig geremd blijkt, aanzienlijk kleiner. Bij gelijkaardige experimenten merkten Calixto *et al.* (2010) op dat de knockdown efficiëntie van neuronale transcripten tussen zenuwcellen varieert wanneer SID-1 er pan-neuronaal wordt geïntroduceerd. Sommige neuronen vertonen er een onbeduidende reductie terwijl de fluorescentie-afname in de zenuwring tot 40% werd gekwantificeerd. Dit effect kan te wijten zijn aan een variërende dsRNA-toegankelijkheid of aan intrinsieke verschillen tussen neurontypes. Omdat het endogene *sid-1* allel in de neuronale *sid-1* expressielijn disfunctioneel is, wordt wegtitratie van de gelimiteerde hoeveelheden dsRNA naar non-

neuronale weefsels alsnog vermeden. Bij de interpretatie van de resultaten moet men dus in rekening brengen dat RNAi-knockdown de hoeveelheden WT product slechts reduceert en dat de grootte van dit effect kan variëren naargelang het doelwitgen.

6.2.2 Uitvoeren van de RNAi-optogenetica screening

De fotorespons werd manueel getest door met het voetpedaal vooruit bewegende wormen in de bacterielaag kortstondig te belichten en de fractie reagerende wormen te bepalen. De hiervoor gehanteerde lichtintensiteit werd geselecteerd in het lineaire deel van de lichtintensiteits-respons curve die voor de *sid-1*;ASH::Chr2 lijn werd opgesteld. Hierdoor wordt de kans op vertekende resultaten door schommelingen in lichtintensiteit beperkt. Bovendien werd de fractie reagerende wormen telkens tegen de negatieve controle van diezelfde dag genormeerd.

In een vervolg experiment werd de fotorespons van transgene wormen met een genomische deletie of RNAi-neeeregulatie van enkele genen die bij het manueel testen van de gedragsrespons een significant effect vertoonden, gekwantificeerd met behulp van de OptoTracker. Optogenetische analyses gebeurden ditmaal nadat wormen op ongezaaide NGM plaatjes werden getransfereerd. Het ontbreken van bacteriën leidt tot een intensief zoekgedrag waardoor wormen zich met hoge snelheid over de plaat verplaatsen (Gray *et al.*, 2005). Na een dertigtal minuten houden de frequente *reversals* op waardoor alle wormen aan ongeveer dezelfde snelheid kruipen. Voor optogenetische analyse betekent dit dat de condities net voor illuminatie nagenoeg constant zijn, wat ten goede komt aan de statistische analyse van de minimale snelheden na illuminatie.

Tracking-experimenten werden ook op gezaaide NGM plaatjes herhaald om de omstandigheden van de manuele RNAi-optogenetica screening perfect na te bootsen (data niet afgebeeld). Voedsel is namelijk als voornaamste gedragsmodulator verantwoordelijk voor de switch tussen gedragsvormen, maar heeft ook een invloed op ASH activiteit.

In onderstaande paragrafen wordt de bespreking van de resultaten uit de RNAi-optogenetica screening en *tracking*-experimenten ingedeeld in verschillende secties.

6.2.3 Controles

Om het fenotype-bereik waarin *hits* zich manifesteren af te lijnen, voegden we aan de lijst kandidaat genen enkele controles toe. Een eerste controle is het *eat-4* gen dat codeert voor de belangrijkste vesiculaire glutamaat transporter die nodig is voor de incorporatie van glutamaat in synaptische vesikels (Lee *et al.*, 1999). Synaptische vesikels worden na ASH-activatie in de synapsspleet vrijgezet, waarna glutamaat de postsynaptische excitatorische AMPA en NMDA-type ionotropische glutamaat receptor op de *command* interneuronen (CI) kan activeren (Bargmann, 2006). De tweede controle bestaat uit RNAi van het *glr-1* gen, dat codeert voor een receptor subeenheid van het AMPA-type aanwezig in motorneuronen en

interneuronen. Het genproduct is noodzakelijk voor de ASH-gemedieerde vermijdingsrespons voor osmotische, mechanische en chemische stimuli (Chao *et al.*, 2004; Hart *et al.*, 1999; Mellem *et al.*, 2002). Wormen vertonen na knockdown van zowel *eat-4* als *glr-1*, zoals verwacht, een duidelijke verlaagde respons na ASH fotoactivatie.

Naast genen met duidelijke synaptische functie, werd ook een gen betrokken bij de ontwikkeling van het zenuwstelsel geselecteerd. Het pan-neuronale *unc-119* is essentieel voor onder andere de vertakking van axonen. Mutanten vertonen aberrante bewegingen en gebrekkig sensorisch gedrag (Maduro *et al.*, 2000).

VGCCs zijn verantwoordelijk voor de Ca^{2+} -influx na membraan-depolarisatie, die zowel neurotransmissie initieert en de depolarisatie verder aandrijft. Ratiometrische Ca^{2+} -metingen toonden aan dat het enige L-type VGCC in *C. elegans*, EGL-19, noodzakelijk is voor de ASH calcium-respons na activatie door diverse aversieve stimuli (Hilliard *et al.*, 2005). Dit hebben we bevestigd in de manuele RNAi-optogenetica screening. Wormen met *egl-19* knockdown vertoonden een afwijkende fotorespons. Neerregulatie van *unc-2*, waarvan het genproduct het enige non-L-type VGCC vormt (Schafer en Kenyon, 1995), leverde daarentegen geen observeerbaar fenotypisch effect. Dit is conform aan eerdere resultaten van Hilliard *et al.* (2005), waarbij een deletieallel van *unc-2* niet resulteerde in een meetbaar verschil op de calcium-influx in ASH.

6.2.4 Signaaltransductie bij chemosensatie

ASH brengt verschillende G α -proteïnen tot expressie. Knockdown van *odr-3* en *gpa-3*, de voornaamste G α -eiwitten betrokken bij ASH chemosensatie, leverde geen verschil in de respons na ASH-fotostimulatie. Deze bevinding doet terugdenken aan de initiële optogenetische experimenten bij *C. elegans* waarbij MRN-fotoactivatie in wormen met defectieve MEC-4/MEC-10 mechanosensorische ionkanalen toch mogelijk is (Nagel *et al.*, 2005). Sensorische cellen worden dus via ChR2 onafhankelijk van hun primaire sensorische eiwitten geactiveerd.

Het traditionele model van ASH chemosensatie stelt dat geactiveerde G-proteïnen via de synthese van bepaalde vetzuren het OSM-9/OCR-2 complex van TRPV eiwitten kunnen openen (Kahn-Kirby *et al.*, 2004). Een gelijkaardig mechanisme werd reeds bij *Drosophila* waargenomen, alwaar G $_q$ en fosfolipase C instaan voor activatie van TRPC kanalen (Hardie, 2001). Verschillende accessoire proteïnen zouden het OSM-9/OCR-2 transductiecomplex competent maken om expliciet op osmotische of chemische stimuli te kunnen reageren. Zo zou het cytoplasmatische OSM-10 als modaliteits-specifiek accessoir proteïne instaan voor osmosensorische signalering in ASH, waardoor *osm-10 null* mutanten hyperosmolaire omgevingen niet vermijden maar toch responsief blijven voor andere aversieve stoffen en fysische krachten (Hart *et al.*, 1999). QUI-1, een cytoplasmatisch proteïne met verschillende

WD40 domeinen, blijkt dan weer noodzakelijk te zijn voor de ASH-gemedieerde ontwijking van het bittere alkaloid quinine (Hilliard *et al.*, 2004). *osm-10* dook evenwel niet op als *hit* uit onze RNAi-optogenetica screening terwijl de fractie reagerende wormen na *qui-1* knockdown wel afweek. We veronderstellen dat OSM-10, net als de voornaamste chemosensorische G-proteïnen, “*bypassed*” wordt tijdens fotoactivatie.

WD40 domeinen zijn betrokken in diverse cellulaire processen waarbij deze fungeren als proteïne-proteïne of proteïne-DNA interactie platforms. Door verschillende van deze korte, 40 aminozuren lange structurele motieven te combineren, wordt een domein met β -propeller architectuur gevormd (Xu en Min, 2011). Aangezien verschillende van deze WD40 proteïnes bij intraflagellair transport (IFT) betrokken zijn, een cruciaal proces in cilium biogenese en onderhoud, speelt QUI-1 hoogstwaarschijnlijk een rol in de correcte ciliaire lokalisatie van sensorische proteïnes zoals bijvoorbeeld GPCRs. Een aberrante lokalisatie van het opsine zou dan ook de verminderde fotorespons bij neerregulatie van *qui-1* transcripten verklaren.

6.2.5 Signaaltransductie bij mechanosensatie

In de inleiding werd al aangegeven dat de TRPV-homologen OSM-9 en OCR-2 essentieel zijn voor de functionaliteit van ASH. Omdat deze eiwitten voor hun correcte expressie en subcellulaire cilia-lokalisatie onderling van elkaar afhankelijk zijn en omdat zij betrokken zijn bij transductie van fysische stimuli (Tobin *et al.*, 2002), werd aangenomen dat beide deel uitmaken van het ASH mechano-elektrisch transductiecomplex (MeT complex). Bovendien is ChR2-gemedieerde ASH fotoactivatie in *osm-9* mutanten mogelijk, wat veronderstelt dat het genproduct als primair transductiekanaal door ChR2 wordt “*gebypassed*” (Guo *et al.*, 2009). Elektrofysiologische studies toonden echter aan dat het *degerin/epithelial* Na⁺ kanaal (DEG/ENaC) DEG-1 het belangrijkste MeT kanaal in de nociceptor is. Additionele kleinere stromen zijn meetbaar na fysische stimulatie van ASH neuronen in *deg-1* mutanten, en deze worden door een *osm-9*- en *ocr-2*-onafhankelijk en nog steeds ongekend ionkanaal opgewekt (Geffeney *et al.*, 2011). Tussen de potentiële kandidaten voor dit kanaal vindt men naast TRP eiwitten ook leden uit de evolutionair geconserveerde Piezo familie van ionkanalen (Coste *et al.*, 2012). Vermoedelijk is functionele redundantie tussen MeT complexen een fundamentele eigenschap van mechanoreceptor neuronen (MRN) (Geffeney en Goodman, 2012). Om het uitblijven van een respons na neus-aanraking van *osm-9* mutanten te verklaren, moet men weten dat het gedragsfenotype van *osm-9 null* mutanten ook door FLP en OLQ neuronen wordt bepaald. Deze staan samen met ASH in voor de ontwikingsreflex na mechanische stimulatie van de neus. Hun gevoeligheid voor mechanische stimuli is bovendien sterk afhankelijk van OSM-9 (Chatzigeorgiou *et al.*, 2010; Chatzigeorgiou en Schafer, 2011).

Een hypothese die recentelijk door verschillende onderzoeksgroepen werd geformuleerd, is dat TRPV kanalen voor essentiële post-transductionele gebeurtenissen zoals

signaalcodering of amplificatie zouden instaan (Geffeney *et al.*, 2011). Bovendien werden verschillende mechanoreceptor neuronen gekarakteriseerd waarin TRPs meerdere functies bekleden, waaronder de auditieve neuronen in *Drosophila* (Göpfert *et al.*, 2006). Aangezien heterologe expressie van TRPV4 de respons voor hyperosmotische en mechanische stimuli in *osm-9 null* mutanten kan herstellen (Liedtke *et al.*, 2003), hebben TRPV eiwitten hoogstwaarschijnlijk een gelijkaardige post-transductionele rol in zoogdierneuronen. Deze vermeende functie is verenigbaar met overige pleiotropische functies van TRPV kanalen in zoogdier-nociceptors, zoals temperatuurdetectie en inflammatie-geïnduceerde perifere sensitisatie (Basbaum *et al.*, 2009; Liedtke *et al.*, 2003).

Uit onze experimenten bleek dat zowel na neerregulatie van *ocr-2* als van *osm-9*, wormen minder responsief waren voor ASH fotoactivatie bij manuele belichting. Bij de kwantificatie van de fotorespons van deze RNAi wormen bleven significante statistische verschillen met wormen opgegroeid op bacteriën die de lege L4440 RNAi vector bezitten echter uit. Zoals vermeld worden er bij *tracking*-experimenten kleinere lichtintensiteiten gebruikt in vergelijking met deze bij manuele belichting. Andere onderzoeksgroepen gebruiken voor dergelijke kwantitatieve analyses doorgaans hogere lichtintensiteiten, en een afwijkend optogenetisch-geïnduceerd gedrag na RNAi-knockdown is mogelijkwijze enkel zichtbaar bij intensere beschijning (Husson *et al.*, 2012b). Desondanks ondersteunen onze data bovenstaande hypothese die stelt dat beide TRPV kanalen een cruciale rol spelen in een latere fase van de sensorische perceptie: de codering en transmissie van sensorische informatie. Beide kanalen zouden dus ook bij chemosensatie stroomafwaarts van een nog onbekend transductiekanaal fungeren. Naast hun directe activiteit in neuronale signaaltransductie, reguleren *osm-9* en *ocr-2* ook nog de expressie van chemoreceptor- en neurotransmittergenen in sensorische neuronen (S. Zhang *et al.*, 2004). Mogelijkwijze heeft neerregulatie van de transcripten ook hierdoor een effect op het optogenetisch-geïnduceerde gedrag.

C. elegans bevat maar liefst 24 TRP kanalen (Goodman en Schwarz, 2003). Aangezien TRPV kanalen zouden kunnen instaan voor essentiële post-transductie signalering, hebben we bijkomende TRP eiwitten met ASH expressie in de RNAi-optogenetica screening getest. Er werden echter geen duidelijke fenotypes opgemerkt. Ook enkele K⁺ kanalen die in ASH voorkomen werden aan de lijst van kandidaat-genen toegevoegd. Hiervan had enkel *unc-103* een effect op de fotorespons bij RNAi-neeerregulatie. Het gen codeert een *ether-a-go-go*-gerelateerd (ERG) K⁺ kanaal homoloog, en speelt een belangrijke rol in spiercontractie (Reiner *et al.*, 1995). Eén van de isoformen komt ook sterk tot expressie in neuronen, en is vermoedelijk betrokken bij het tot stand komen van de neuronale membraanpotentialiaal (Reiner *et al.*, 2006).

6.2.6 Modulatie van ASH sensorisch gedrag

In paragraaf § 1.1.4 gaven we al aan dat de dynamica van het tweeledige circuit voor terugtrekkingsinitiatie stroomafwaarts van ASH door differentiële sensorische prikkels kan worden gereguleerd. Bovendien is het zo dat een opmerkelijk aantal voedsel-afhankelijke modulerende pathways rechtstreeks inwerkt op de ASH neuronen. Verschillende studies toonden bijvoorbeeld aan dat serotonine en octopamine de activiteit van het ASH neurale netwerk op antagonistische wijze moduleren. Daarenboven suggereren verschillende studies dat bepaalde componenten van het ASH neurale netwerk voorkomen in twee verschillende activiteitstoestanden, waarbij modulerende *inputs* de overgang tussen beide toestanden bemiddelen (Mills *et al.*, 2012). Zowel de directe als indirecte regulatie van nociceptor-activiteit door onder meer biogene amines, blijkt evolutionair geconserveerd (Walters en Moroz, 2009). Intracellulair kan de gevoeligheid van nociceptors gereguleerd worden op het niveau van de transductiemachinerie, post-transductionele signaleringssystemen of beide. Nociceptor sensitisatie doelt dan ook op de versterkte respons van de cel na detectie van aversieve stimuli, maar ook op een verlaging van de drempelwaarde voor nociceptor activatie (Walters en Moroz, 2009).

De effecten van modulerende *inputs* op het sensorisch gedrag zijn subtiel, waardoor men in de RNAi-optogenetica screening in principe slechts subtiele effecten ter hoogte van het locomotorisch gedrag mag verwachten na belichting. Ook belangrijk voor deze studie is dat enkel ASH wordt geactiveerd, zodat enkel de bijdrage ter hoogte van het ASH neuronale netwerk kan worden gemeten binnen de complexe dynamica van het integraal sensorisch systeem. Een conceptueel model van serotonine (5-HT) en octopamine (OA) modulatie van de aversieve responsen ter hoogte van de ASH neuronen, is weergegeven in figuur 19.

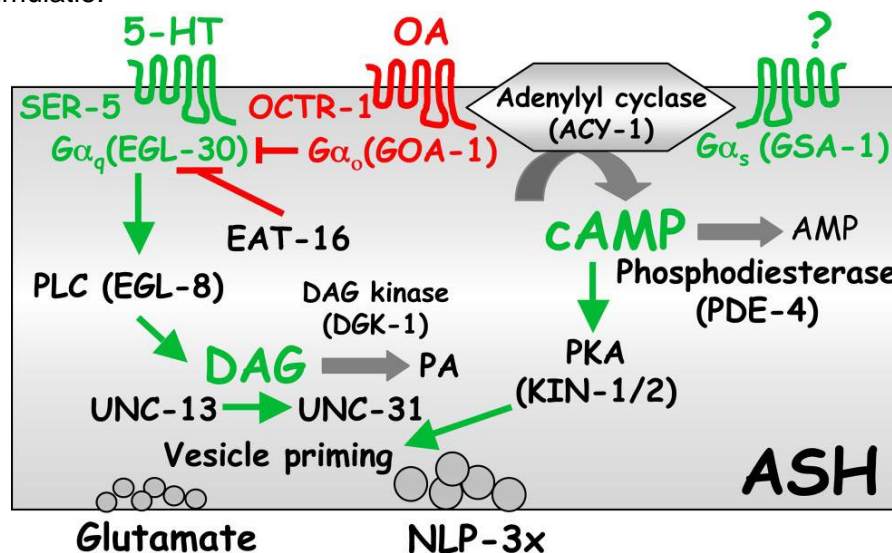
6.2.6.1 Monoamine neurotransmitters

Serotonine

De ASH respons op aversieve stimuli wordt versterkt in aanwezigheid van voedsel, een proces waarbij de verhoogde gevoeligheid hoofdzakelijk door 5-HT wordt veroorzaakt. 5-HT is onder meer betrokken bij voedsel-afhankelijke modulatie van voortbeweging (Sawin *et al.*, 2000) en van het eetgedrag (Horvitz *et al.*, 1982). Het monoamine wordt bij aanwezigheid van bacteriën in de farynx ook vrijgesteld in het pseudocoeloom door gespecialiseerde sensorische cellen (Ranganathan *et al.*, 2001). Door hormonaal allerlei receptoren te activeren, werkt 5-HT in op verschillende niveaus van het ASH-gemedieerde locomotorisch circuit in (Harris *et al.*, 2009). 5-HT stimuleert bijvoorbeeld het vermijdingsgedrag voor verdunde (30%) octanol, een proces dat afhankelijk is van GPA-11, een Gα-proteïne dat uitsluitend in ASH en ADL sensorische neuronen voorkomt (Jansen *et al.*, 1999). Bovendien is de Ca²⁺-influx na milde fysische stimulatie van de neus enkel meetbaar in aanwezigheid

van 5-HT, wat aantoont dat het monoamine rechtstreeks de gevoeligheid van ASH versterkt (Hilliard *et al.*, 2005). Serotonine beïnvloedt ook additionele neuronen die betrokken zijn bij de ontwijking van aversieve stimuli (Harris *et al.*, 2009). De ontwijkingsrespons voor verdunde octanol wordt bij voedselaanwezigheid dan ook uitsluitend bemiddeld door het ASH neuronenvaar (Chao *et al.*, 2004). Bij uitgehongerde individuen wordt de ASH activiteit daarentegen teruggedrongen, terwijl simultaan ADL en AWB sensorische neuronen worden gerekruteerd in nociceptisch gedrag (Chao *et al.*, 2004). Door deze modulerende invloed op meerdere cellulaire targets kan 5-HT-signalering het gedrag nauwkeurig afstellen op omgevingscondities.

Ter hoogte van het ASH neuronenvaar wordt verondersteld dat de SER-5 receptor, die verwant is met de zoogdier 5-HT₆ receptor, de gevoeligheid van deze zenuwcellen voor terugtrekkingsinitiatie verhoogt (Chao *et al.*, 2004; Harris *et al.*, 2009). Zo is in aanwezigheid van voedsel, geen stijging merkbaar van de aversieve respons bij *ser-5 null* wormen, dit in tegenstelling tot WT wormen. In lijn met de bevinding dat bij voedselaanwezigheid de octanol-gevoeligheid ongewijzigd blijft in WT wormen met ASH-selectieve knockdown van *ser-5* (Harris *et al.*, 2010), resulteerde *ser-5* RNAi in onze screening in een significant lagere fotorespons in vergelijking met controle dieren. Hoewel GPA-11 een rol speelt in de 5-HT-stimulatie, koppelt SER-5 hoogstwaarschijnlijk niet aan dit proteïne (Hart en Chao, 2010). Niettemin leidt neerregulatie van het *gpa-11* gen in deze studie tot verminderde respons bij ASH fotostimulatie.



Figuur 19: Conceptueel model van G-proteïne modulatie van de aversieve respons gemedieerd door de ASH neuronen. Groen en rood stellen respectievelijk stimulatie of inhibitie van het ontwijkingsgedrag voor bij gematigde octanol concentraties. Figuur uit Harris *et al.* 2010.

In neuronen worden twee vesikelpopulaties vrijgesteld tot in de extracellulaire omgeving door middel van exocytose. Naast de klassieke synaptische vesikels (SV) die conventionele neurotransmitters zoals glutamaat insluiten, worden ook *dense core* vesikels (DCV)

geobserveerd. Laatstgenoemde structuren zijn over gans het zenuwuiteinde verspreid en bevatten neuropeptiden die specifiek de gevoeligheid van zowel pre- als postsynaptische zenuwcellen kunnen moduleren door activatie van G-proteïne gekoppelde receptoren. De exocytose-machinerie is voor beide vesikelpopulaties grotendeels geconserveerd. Zo is het diacylglycerol-bindend proteïne UNC-13 nodig voor de *priming* van zowel SVs als DCVs (Richmond *et al.*, 1999). Voor UNC-31 werd reeds aangetoond dat het selectief betrokken is bij het *docken* van fusie-competente DCVs (Zhou *et al.*, 2007; Speese *et al.*, 2007), alhoewel bepaalde studies het proteïne ook in de fusie van SVs met het plasmamembraan impliceerden (Renden *et al.*, 2001). In onze experimenten resulteerde neerregulatie van *unc-13* in een verlaagde respons na fotostimulatie, wat rijmt met de geobserveerde effecten na knockdown van *eat-4*, het gen dat codeert voor de belangrijkste vesiculaire glutamaat transporter die nodig is voor de incorporatie van glutamaat in synaptische vesikels (Lee *et al.*, 1999).

Zowel $G\alpha_q$ (EGL-30) als $G\alpha_s$ (GSA-1) signalering zijn essentieel voor serotonine-gemedieerde ASH sensitivatie. De receptor die GSA-1 activeert, werd nog niet geïdentificeerd terwijl EGL-30 stroomafwaarts, al dan niet rechtstreeks onder SER-5 opereert (Harris *et al.*, 2009). Onze RNAi-optogenetica screening kon echter geen significant afwijkende respons bij *egl-30* neerregulatie vaststellen. Om de betrokkenheid van *egl-30* in de ASH-aversieve respons aan te tonen, gebruikten Harris *et al.* (2010) wel een ASH-selectieve RNAi strategie waarbij *sense* en *antisense* RNA onder controle van de *sra-6* promotor tot expressie werden gebracht. Hierdoor is zeer efficiënte en doelgerichte knockdown mogelijk. Bovendien toont diezelfde studie aan dat voor de 5-HT-gemedieerde stimulatie het voldoende is slechts één G-proteïne pathway te activeren zolang de basale signalering van de andere maar behouden blijft. *Egl-30* kent een breed neuronaal expressiepatroon en staat voor diverse functies in (Bastiani en Mendel, 2006). Bovendien nemen in principe alle zenuwcellen van de gebruikte neuronale *sid-1* expressielijn RNAi *triggers* op, waardoor de kans op specifieke effecten steeds bestaat, de beperkte concentraties dsRNA weggetitreerd kunnen worden en de basale activiteit van EGL-30 in ASH neuronen zo gevrijwaard blijft.

Lokalisatiestudies met behulp van GFP reporterconstructen toonden aan dat *nlp-3*, *nlp-15* en *flp-21* neuropeptiden tot expressie komen in ASH (Nathoo *et al.*, 2001; Rogers *et al.*, 2003; Kim en Li, 2004). $G\alpha_s$ (GSA-1) signalering en proteïne kinase A (PKA) activatie stimuleren de exocytose van DCVs, een proces waarbij neuropeptiden dan ook worden vrijgezet (Charlie *et al.*, 2006). De drie neuropeptiden gecodeerd door het *nlp-3* gen worden ook nog samen met 5-HT door serotonergische neuronen en glutamaat uit andere sensorische neuronen vrijgezet (Nathoo *et al.*, 2001). Niettemin is de vrijstelling van de NLP-3-peptiden door het ASH neuronenpaar essentieel voor de 5-HT-stimulatie van ASH-gemedieerde aversieve

responsen (Harris *et al.*, 2010). Door middel van genetische analyses werd aangetoond dat deze peptiden vermoedelijk inwerken op de NPR-17 GPCR die men terugvindt in enkele neuronen in staart en kop, waaronder ASI (Harris *et al.*, 2010). Van het chemosensorische ASI amphide neuronenpaar werd reeds aangetoond dat het het locomotorisch gedrag moduleert door *reversals* en *omega bends* te onderdrukken (Gray *et al.*, 2005), maar het exacte mechanisme waarop NLP-3-peptiden de monoaminergische modulatie van ASH-respons bewerkstelligen is echter nog niet gekend. In onze handen vertoont *nlp-3* RNAi, tegen de verwachtingen in, geen significante wijziging van de fotorespons. In vergelijking met klassieke neurotransmitters hebben neuropeptiden een veel sterkere affiniteit voor hun receptoren. Zo hebben zoogdierpeptiden doorgaans een nanomolaire tot micromolaire affiniteit voor hun receptor terwijl deze van acetylcholine schommelt tussen 100 μ M en 1 mM (Mains en Eipper, 1999). Kleine hoeveelheden residueel *nlp-3* product zouden hierdoor voldoende kunnen zijn voor het behoud van de ASH-gemedieerde aversieve respons. Ook bleef na neerregulatie van *unc-31*, waarvan het genproduct selectief nodig is voor het *docken* van fusie-competente DCVs, de fotorespons ongewijzigd. Bij *C. elegans* kan PKA activatie het ongecoördineerde fenotype van *unc-31* mutanten tenietdoen door rechtstreeks de exocytose van DCVs te stimuleren, wat mogelijkwijze het uitblijven van een effect na *unc-31* knockdown verklaart (Charlie *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2007). $G\alpha_q$ -gemedieerde stimulatie van aversieve responsen blijkt daarentegen niet afhankelijk van de DCV-gemedieerde exocytosis van *nlp-3* peptiden. Harris *et al.* (2010) formuleerden de hypothese dat $G\alpha_q$ signalering de glutamaat-vrijstelling vanuit SVs op UNC-13-afhankelijke wijze aandrijft, een signaaltransductiecascade analoog aan deze voor de vrijstelling van acetylcholine in de *C. elegans* neuromusculaire junctie (Lackner *et al.*, 1999). EGL-30 zou op basis van ratiometrische Ca^{2+} -metingen echter rechtstreeks de Ca^{2+} -respons van het nociceptor neuron kunnen beïnvloeden (Esposito *et al.*, 2010).

Het *egl-3* gen codeert voor het belangrijkste *C. elegans* propeptidase dat noodzakelijk is voor de verwerking van inactieve peptide precursoren tot mature, bioactieve peptiden (Kass *et al.*, 2001). *Egl-3* mutanten hebben hierdoor een sterk gereduceerd peptidenprofiel (Husson *et al.*, 2006). Daarenboven vertonen deze mutanten bij voedselafwezigheid of bij exogene toediening van 5-HT dezelfde vermijdingsrespons als WT wormen indien ze blootgesteld worden aan verdunde octanol (Harris *et al.*, 2010). *Egl-3*-RNAi resulteerde in ons experiment in een gewijzigde fotorespons van ASH-neuronen. Onze bevindingen onderstrepen nogmaals het belang van neuropeptides in de stimulatie van het ASH-gemedieerd ontwijkgingsgedrag.

Opmerkelijk is dat RNAi van het *tph-1* gen geen invloed op de fotorespons bleek te hebben. Het genproduct, tryptofaan hydroxylase, is het katalyserend enzyme in de 5-HT-biosynthese (Sze *et al.*, 2000). Ook *cat-1*, dat een monoamine transporter die instaat voor de opname

van 5-HT en dopamine in de synaptische vesikels codeert (Duerr *et al.*, 1999), vertoonde na knockdown geen fenotype. Het uitblijven van duidelijke effecten is hoogstwaarschijnlijk te wijten aan een gebrekkige RNAi-neerregulatie van de transcripten.

Dopamine

Ook dopamine (DA) fungeert als een signaal voor voedselaanwezigheid en het heeft belangrijke effecten op het locomotorisch gedrag van *C. elegans* (Avery en Horvitz, 1990; Sawin *et al.*, 2000). Gespecialiseerde sensorische cellen, die longitudinaal ingebed zijn in de cuticula, nemen de fysieke prikkels waar die veroorzaakt worden door het kruipen doorheen bacteriën (Li *et al.*, 2011). Na deze sensorische waarneming zetten deze MRNs dopamine vrij, dat op extrasynaptische wijze met verschillende cellen communiceert. Ezcurra *et al.* (2011) toonden aan dat de dopaminergische neuronen de acute aanwezigheid van voedsel seinen om de ASH-gemedieerde ontwijkingsrespons voor toxische chemische componenten te stimuleren. Dit signaal, dat ogenblikkelijk tot stand komt door de externe gewaarwording van bacteriën, wordt enkel tijdens een continu verblijf in voedselrijke omgeving onderhouden en wordt niet beïnvloed door interne signalen met betrekking tot nutritionele status. DA-gemedieerde toename in ASH sensorische responsiviteit voor chemische stoffen wordt waarschijnlijk door drie verschillende pathways veroorzaakt. Eerst en vooral zal DA via de cel-autonome DOP-4 receptor rechtstreeks op ASH inwerken om de sensorische signaaltransductie specifiek voor chemische componenten, zoals koper, te versterken. De overige twee pathways treden op *dop-4*-onafhankelijke wijze op om tijdens voedselaanwezigheid zowel de adaptatie na herhaalde stimuli in te dijken en de initiële Ca²⁺-respons voor bijvoorbeeld glycerol te verlengen. De moleculen verantwoordelijk voor laatstgenoemd proces blijven evenwel ongeïdentificeerd (Ezcurra *et al.*, 2011).

Ezcurra *et al.* (2011) gebruikten dezelfde AQ2235 lijn als in deze studie, die specifiek ChR2 tot expressie brengt in de ASH neuronen. Zowel de frequentie als de intensiteit van de omkeringen na ASH fotostimulatie bleef na exogene DA toediening ongewijzigd. Dit vormde dan ook een extra argument om aan te nemen dat DA uitsluitend de gevoeligheid voor chemische stoffen verhoogt, veeleer dan een invloed uit te oefenen op de algemene excitabiliteit en/of synaptische activiteit van de ASH neuronen. Onze resultaten toonden daarentegen een verminderde respons na ASH-fotoactivatie bij knockdown van *dop-4*, wat eerder aanwijst dat dopamine wel belangrijk is voor de algemene respons van ASH voor aversieve stimuli. Gebruikmakend van reporterconstructen werd aangetoond dat DOP-4 een variabele expressie vertoont in verschillende kopneuronen (Sugiura *et al.*, 2005). Het is dus ook mogelijk dat *feeding* RNAi en/of exogene DA toediening ongerelateerde processen beïnvloeden. Anderzijds observeerden Ezcurra *et al.* (2011) ook geen significante verschillen in de ASH fotorespons bij aan- en afwezigheid van voedsel. Aangezien de onderzochte

pathways modulerend werken, zijn defecten mogelijks enkel merkbaar bij submaximale fotoactivatie.

Octopamine

DA kan ook indirect zijn rol uitoefenen door de productie van andere neuromodulators, in het bijzonder octopamine (OA), te reguleren (Wragg *et al.*, 2007). DA bindt de DOP-3 receptor in de RIC neuronen om de OA vrijgave te onderdrukken (Suo *et al.*, 2009; White *et al.*, 1986). Hoewel enkel de RIC interneuronen en twee niet-neuronale gonadale schedecellen in staat zijn OA te produceren, moduleert dit amine verschillende cruciale aspecten van het *C. elegans* gedrag (Alkema *et al.*, 2005). Belangrijk is op te merken dat OA receptoren significante homologie vertonen met zoogdier alpha-adrenergische (α -AR) receptoren, die een belangrijke rol vervullen in pijnsensatie. Bij *C. elegans* vindt men een complexe interactie tussen drie OA α -adrenergisch-achtige receptoren die de ASH-gemedieerde aversieve responsen inhiberen (Mills *et al.*, 2012). Bij submaximale stimulatie, bijvoorbeeld door blootstelling aan 30% 1-octanol, zijn de ASH sensorische neuronen hoofdzakelijk verantwoordelijk voor de uitgelokte terugtrekkingsreflex (Chao *et al.*, 2004). Middelmatige OA concentraties werken via hun OCTR-1 receptor rechtstreeks in op ASH om de vrijstelling van glutamaat en neuropeptiden te inhiberen (Wragg *et al.*, 2007; Harris *et al.*, 2009, 2010). Dit zou zowel kunnen door inhibitie van adenylyl cyclase of door de SER-5/EGL-30 signalering te stoppen (Harris *et al.*, 2010). Bij hoge OA concentraties antagoniseert een tweede receptor, SER-3, de effecten van OCTR-1 signaaltransductie. Basale aversieve responsen worden bijgevolg nauwelijks beïnvloed door OA, indien ASH submaximaal wordt gestimuleerd. Wanneer schadelijke stimuli toenemen, zoals het geval is bij blootstelling aan 100% 1-octanol, worden ook andere cellen bij de aversieve respons betrokken. OA is in zulke omstandigheden in staat de aversieve respons na 1-octanol waarneming sterk in te dijken door, via SER-6 receptoren op AWB, ADL en ASI sensorische neuronen, de vrijstelling van een arsenaal neuropeptiden te stimuleren. Deze peptiden inhiberen uiteindelijk de ASH-gemedieerde aversieve responsen, hoofdzakelijk op humorale wijze. Enkele neuropeptiden opereren ook buiten het ASH-geïnnerveerde circuit (Mills *et al.*, 2012). Algemeen kan men stellen dat de OA- en SER-6-afhankelijke peptiden inwerken op sensorische neuronen die aversieve responsen inperken waardoor chemoattractieve en chemorepulsieve signalen worden geïntegreerd (Mills *et al.*, 2012). Voor onze studie betekent dit dat de ASH-gemedieerde aversieve respons door tonische signalering van andere sensorische neuronen kan worden ingedijkt. Het verstoren van deze regulatie, zoals knockdown van een essentiële factor betrokken bij neuropeptiden-verwerking (*egl-3*), leidt dan uiteraard tot aanzienlijke effecten op het ASH-fotoactivatie ontwijkingsgedrag.

In een eerdere studie bleef de ASH-aversieve respons bij toevoeging van exogeen serotonine dezelfde bij WT wormen en wormen met ASH-specifieke knockdown van de

transcripten van de OCTR-1 OA-receptor en het gekoppelde GOA-1 $G\alpha_o$ -proteïne (Harris *et al.*, 2010). In overeenstemming met de resultaten voor OCTR-1, vertoonden wormen gevoed met *octr-1*-dsRNA-bacteriën geen afwijkende gedragsrespons wanneer we deze belichten in de bacteriebodem. Onder dezelfde omstandigheden vertoonden wormen bij *feeding* RNAi van *goa-1* echter wel een aberrante fotorespons. GOA-1 komt in tegenstelling tot OCTR-1 voor in talrijke weefsels, waaronder alle neuronen, en reguleert er verscheidene fundamentele processen zoals celdeling en synaptische transmissie (Bastiani en Mendel, 2006). Aangezien in principe elk neuron van de gebruikte neuronale *sid-1* expressielijn dsRNA opneemt, bestaat de kans op specifieke effecten. Hoge exogene OA concentraties kunnen de 5-HT stimulatie van aversieve responsen toch belemmeren wanneer *ser-3* transcripten in ASH via neuron-selectieve RNAi gereduceerd zijn (Mills *et al.*, 2012). Dit impliceert namelijk dat OCTR-1 inhibitie niet langer door SER-3 wordt ingeperkt. Analoog aan deze bevinding, vertoonden wormen bij *ser-3* knockdown een verminderde fotorespons in deze experimenten. Aangezien gedurende de RNAi-screening steeds ter hoogte van de bacterielaag werd belicht, suggereert dit resultaat dat de endogene OA concentraties hoog genoeg zijn om SER-3 onder normale omstandigheden te activeren. Dit is echter niet in overeenstemming met de hoge OA concentraties die in principe enkel bij voedselafwezigheid voorkomen (Suo *et al.*, 2009). Wel zijn ASH cellen via verschillende gap-juncties verbonden met de octopaminergische RIC interneuronen, waardoor hoge ASH zou kunnen leiden tot OA vrijgave (Alkema *et al.*, 2005). Sluitende bewijzen hiervoor zijn echter nog niet geleverd.

6.2.6.2 De tachykinine-achtige receptor

Recent werd het GPCR-coderende *C49A9.7* gen door onze onderzoeksgroep geclassificeerd bij de categorie van de tachykinine-achtige receptoren (nog niet gepubliceerd). Aangezien de tachykinine-neuropeptiden sterk evolutionair geconserveerd zijn en als multifunctionele peptiden ook betrokken zijn bij neuromodulatie (Van Loy *et al.*, 2010), hebben we dit neuropeptide receptor gen ook in de manuele RNAi-optogenetica screening getest. Het zoogdier tachykinine *substance P* vervult bovendien een belangrijke functie in nociceptie (Basbaum *et al.*, 2009). *C49A9.7* knockdown wijzigde duidelijk het optogenetisch-geïnduceerd ontwikkelingsgedrag na manuele belichting. Uit de *tracking*-experimenten waarbij de fotorespons van de tachykinine-receptor genomische mutant werd vergeleken met deze van AQ2235, konden echter geen statistische verschillen worden vastgesteld hoewel er voor de gemiddelde snelheidsprofielen telkens een verschil zichtbaar is. Initiële lokalisatie experimenten onthulden expressie van de tachykinine-receptor in enkele, nog ongeïdentificeerde, neuronen in de kop. Het *C49A9.7* gen is daarom een interessante piste voor verder onderzoek. In de toekomst zullen we de *tracking*-experimenten met hogere lichtintensiteiten herhalen en nagaan of ook RNAi van de precursor van het tachykinine neuropeptide de ASH-aversieve respons beïnvloedt.

6.3 Conclusie

Het optogenetisch gedragsplatform voor *whole-field* illuminatie en automatische gedragsanalyse werd onder begeleiding van professor Husson succesvol in de onderzoeksgroep geïmplementeerd. Onze data uit de eerste optogenetische *tracking*-experimenten van transgene wormen met ASH-specifieke ChR2 en pan-neuronale *sid-1* expressie zijn conform aan deze uit eerdere studies. Wel is de gebruikte opstelling nog voor verbetering vatbaar. Voor een vaste microscoopvergroting is het camerabeeld, in vergelijking met dat waargenomen door de oculairen, namelijk iets meer ingezoomd. Om individuele wormen gedurende het gedragsexperiment in beeld te houden zonder testplaatjes te verschuiven, moet men hierdoor een kleinere vergroting, en dus een lagere lichtintensiteit gebruiken. Analoog aan andere opstellingen die door andere onderzoeksgroepen werden beschreven, kan in de toekomst de geautomatiseerde microscoopvoet daarom aan de *tracker* gekoppeld worden zodat de software met behulp van de rechtstreekse videobeelden de worm centraal in beeld houdt (Husson *et al.*, 2013a). Ook kunnen eventueel hogere lichtintensiteiten gebruikt worden door het gebruik van een andere lichtbron.

Door de combinatie van *feeding* RNAi met optogenetische fenotypering kan men snel genen toetsen op hun betrokkenheid bij het signaleringsproces van bepaalde neuronen. Zo sluiten de resultaten van de manuele RNAi-optogenetica screening van het merendeel van de geteste genen aan bij deze uit de literatuur. Dit geeft aan dat de gebruikte strategie kan gebruikt worden om genen te identificeren die betrokken zijn bij de signaaltransductie van de ASH nociceptor. Men moet voor de interpretatie van de resultaten wel steeds rekening houden met de variabiliteit en het onvolledige karakter van knockdown door *feeding* RNAi. Bovendien nemen in principe alle zenuwcellen van de gebruikte neuronale *sid-1* expressielijn RNAi *triggers* op, waardoor de kans op specifieke effecten steeds bestaat en de beperkte concentraties dsRNA weggetitreerd kunnen worden.

Doordat het manueel scoren van de fotorespons te primitief is, zijn *tracking*-experimenten noodzakelijk voor objectieve kwantitatieve data. Binnen het korte tijdsbestek van deze masterproef konden we voor de *tracking*-experimenten één genomische mutant inkruisen. De overige gedragsanalyses gebeurden op neuronale RNAi-gegensensitiseerde wormen, opgegroeid op dsRNA-producerende bacteriën. Significante effecten op de gekwantificeerde gedragsrespons bleven echter uit, wat vermoedelijk te wijten is aan de beperkte lichtintensiteiten. Desondanks impliceren onze data dat TRPV kanalen verantwoordelijk zijn voor essentiële post-transductie signalering in het ASH neuron zoals signaalcodering of amplificatie. Ook de rol van verschillende factoren in de voedsel-afhankelijke stimulatie van ASH-aversieve responsen werd onderzocht.

De manuele RNAi-optogenetica screening biedt voldoende stof voor verder onderzoek. Zo dienen genomische mutanten van alle *hits* gegenereerd te worden, om de *tracking*-

experimenten met deze mutante wormen te herhalen, en dit met hogere lichtintensiteiten. Ons streefdoel is om de testen uit te voeren bij celspecifieke RNAi wormen. Hierbij brengen we *sense* en *antisense* RNA onder controle van een cel-selectief promotor(paar) tot expressie. De knockdown van transcripten is hierbij niet alleen meer robuust, het fenotype wordt dan in principe enkel veroorzaakt ter hoogte van de doelcel aangezien de verspreiding van cel-specifieke RNAi signalen nog niet tussen neuronen werd waargenomen (Esposito *et al.*, 2007).

Aangezien de mechanismen van nociceptie sterk evolutionair geconserveerd zijn, kan men via deze strategie wellicht essentiële factoren identificeren die betrokken zijn bij de detectie en modulatie van pijnprikkels bij de mens. Op deze manier kunnen op termijn de nieuw ontdekte factoren als doelwit dienen voor de ontwikkeling van nieuwe pijnstillende geneesmiddelen.

Samenvatting

De detectie van nociceptieve stimuli veroorzaakt doorgaans een robuuste terugtrekkingsreflex die het organisme behoedt voor lichamelijke schade. De bodemnematode *Caenorhabditis elegans* bezit hiervoor verschillende polymodale nociceptoren waarbij het ASH neuronenaar aversieve prikkels van mechanische, chemische en osmotische oorsprong detecteert. Door channelrhodopsine-2 (ChR2), een exogeen licht-geactiveerd transmembranair kationkanaal, specifiek in ASH neuronen tot expressie te brengen, kan een lichtpuls deze neuronen activeren los van interfererende signalen van andere mechanoreceptoren. Zo bootst de robuuste achterwaartse beweging uitgelokt door blauw licht-beschijning van het volledige nematodenlichaam de natuurlijke vermijdingsrespons na. Dit optogenetisch-geïnduceerd gedrag is kwantificeerbaar via het OptoTracker gedragsplatform dat *whole-field* illuminatie combineert met automatische gedragsanalyse door middel van *video-tracking* technologie. In deze masterproef werd dit platform dan ook binnen onze onderzoeksgroep in gebruik genomen en gekarakteriseerd.

Hoewel verschillende eerstelijns signaleringsfactoren reeds geïdentificeerd werden in ASH, is minder geweten over de modulatie en amplificatie van aversieve signalen binnen deze nociceptor. Om cel-autonome spelers in het outputgedrag van ASH te identificeren, werden de gen transcripten met hypothetische signaleringsfunctie uitgeschakeld door middel van RNA interferentie (RNAi). De respons werd na manuele ASH-fotostimulatie gekwantificeerd. Hiervoor werd eerst een hypergevoelige RNAi lijn gegenereerd door SID-1, een transmembranair eiwit dat essentieel is voor systemische RNAi, pan-neuronaal te introduceren. Succesvolle knockdown van neuronale transcripten werd bevestigd door de verlaagde respons na ASH fotoactivatie bij wormen die gevoederd waren met getransformeerde bacteriën die dsRNA produceren voor genen betrokken bij de ASH signalering. Ook is een reductie van ASH-specifieke YFP fluorescentie merkbaar na RNAi,

een effect dat via confocale microscopie experimenten werd gekwantificeerd. Zo wijst de neerregulatie van de TRPV kanalen OSM-9 en OCR-2 aan dat beide eiwitten stroomafwaarts van de primaire transductiemoleculen voor essentiële post-transductionele gebeurtenissen zoals signaalcodering of amplificatie instaan. Ook de rol van verschillende factoren in de voedsel-afhankelijke stimulatie van ASH-aversieve responsen werd onderzocht. Verdere *video-tracking* experimenten van genomische mutanten zijn echter noodzakelijk om onze bevindingen te valideren.

Aangezien de mechanismen van nociceptie sterk evolutionair geconserveerd zijn, kan men mogelijks via deze strategie essentiële factoren identificeren die een rol vervullen bij de detectie en modulatie van pijnprikkels bij de mens. Op deze manier kunnen op termijn de nieuw ontdekte moleculen dienen als doelwit voor de ontwikkeling van nieuwe pijnstillende geneesmiddelen.

Summary

Nociception generally evokes rapid withdrawal behaviors in order to protect the tissue from damaging insults. In *Caenorhabditis elegans*, several nociceptors are essential for this behavior of which the polymodal ASH neurons detects aversive osmotic, mechanical and chemical stimuli. By expressing channelrhodopsin-2 (ChR2), a directly light-gated cation channel, specifically in ASH, these cells can be selectively photoactivated thus avoiding contributions from other neurons to the evoked behaviors. Whole-field photostimulation of worms, specifically expressing ChR2 in ASH, with blue light evoked robust reversals similar to the native avoidance response. The observed behavior was quantified by means of the OptoTracker platform for optogenetics-based behavioral studies that combines photostimulation of transgenic neurons in freely behaving animals and video analysis. In this master's thesis, the platform is implemented in the research group and characterized.

Although several primary molecular nociceptive sensors have been characterized, less is known about the mechanisms and the molecules that in the ASH nociceptor neurons modulate and amplify the noxious signals. To identify cell-autonomous mediators of ASH function, we knocked down transcripts of genes putatively contributing to post-transduction signaling and quantified the light-evoked ASH-dependent behavior. Prior to this, neurons of transgene worms were made more susceptible to feeding RNA interference (RNAi) by pan-neuronal expression of SID-1, a transmembrane protein required for the passive cellular uptake of dsRNA molecules. Successful neuronal RNAi was validated by the altered light-evoked behavioral responses after knockdown of genes required for normal ASH function. Furthermore, worms fed with bacteria expressing dsRNA for *gfp* showed reduced YFP fluorescence in the ASH neurons, an effect quantified by means of confocal imaging. Our study suggests that the TRPV channels OSM-9 and OCR-2 likely regulate cell activity

downstream of primary transduction molecules such as DEG-1. The involvement of factors in the food-dependent stimulation of ASH-aversive responses was also investigated. However, videotracking experiments of genomic mutants will still have to be performed to validate our findings. As mechanisms of nociception are often evolutionary conserved, our approach may potentially uncover valid targets for the development of novel analgesics.

Referenties

- Abdulla FA & Smith PA (1997) Ectopic alpha2-adrenoceptors couple to N-type Ca²⁺ channels in axotomized rat sensory neurons. *The Journal of neuroscience* **17**: 1633–41
- Airan RD, Thompson KR, Fenno LE, Bernstein H & Deisseroth K (2009) Temporally precise in vivo control of intracellular signalling. *Nature* **458**: 1025–9
- Alkema MJ, Hunter-Ensor M, Ringstad N & Horvitz HR (2005) Tyramine Functions independently of octopamine in the *Caenorhabditis elegans* nervous system. *Neuron* **46**: 247–60
- Avery L & Horvitz HR (1990) Effects of starvation and neuroactive drugs on feeding in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of experimental zoology* **253**: 263–70
- Axel R (2005) Scents and sensibility: a molecular logic of olfactory perception (Nobel lecture). *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **44**: 6110–27
- Bamann C, Kirsch T, Nagel G & Bamberg E (2008) Spectral characteristics of the photocycle of channelrhodopsin-2 and its implication for channel function. *Journal of molecular biology* **375**: 686–94
- Banghart M, Borges K, Isacoff E, Trauner D & Kramer RH (2004) Light-activated ion channels for remote control of neuronal firing. *Nature neuroscience* **7**: 1381–6
- Bargmann C (1998) Neurobiology of the *Caenorhabditis elegans* genome. *Science* **282**: 2028–33
- Bargmann C (2006) Chemosensation in *C. elegans*. *WormBook*: 1–29
- Bargmann C & Kaplan J (1998) Signal transduction in the *Caenorhabditis elegans* nervous system. *Annual review of neuroscience* **21**: 279–308
- Bargmann C & Mori I (1997) Chemotaxis and Thermotaxis. In: *C. elegans II* (Riddle D Blumenthal T Meyer B & Priess J, Eds) Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Bargmann C, Thomas JH & Horvitz HR (1990) Chemosensory cell function in the behavior and development of *Caenorhabditis elegans*. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **55**: 529–38
- Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G & Julius D (2009) Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* **139**: 267–84
- Bastiani C & Mendel J (2006) Heterotrimeric G proteins in *C. elegans*. *WormBook*: 1–25

- Berndt A, Schoenenberger P, Mattis J, Tye KM, Deisseroth K, Hegemann P & Oertner TG (2011) High-efficiency channelrhodopsins for fast neuronal stimulation at low light levels. *PNAS* **108**: 7595–600
- Berndt A, Yizhar O, Gunaydin LA, Hegemann P & Deisseroth K (2009) Bi-stable neural state switches. *Nature neuroscience* **12**: 229–34
- De Bono M & Maricq AV (2005) Neuronal substrates of complex behaviors in *C. elegans*. *Annual review of neuroscience* **28**: 451–501
- Boutros M & Ahringer J (2008) The art and design of genetic screens: RNA interference. *Nature reviews. Genetics* **9**: 554–66
- Boyden ES, Zhang F, Bamberg E, Nagel G & Deisseroth K (2005) Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nature neuroscience* **8**: 1263–8
- Butt HJ, Fendler K, Bamberg E, Tittor J & Oesterhelt D (1989) Aspartic acids 96 and 85 play a central role in the function of bacteriorhodopsin as a proton pump. *The EMBO journal* **8**: 1657–63
- Byerly L, Cassada RC & Russell RL (1976) The life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology* **51**: 23–33
- Calixto A, Chelur D, Topalidou I, Chen X & Chalfie M (2010) Enhanced neuronal RNAi in *C. elegans* using SID-1. *Nature methods* **7**: 554–9
- Chalfie M, Sulston J, White JG, Southgate E, Thomson JN & Brenner S (1985) The neural circuit for touch sensitivity in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of neuroscience* **5**: 956–64
- Chalfie M & Thomson JN (1979) Organization of neuronal microtubules in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of cell biology* **82**: 278–89
- Chao MY, Komatsu H, Fukuto HS, Dionne HM & Hart A (2004) Feeding status and serotonin rapidly and reversibly modulate a *Caenorhabditis elegans* chemosensory circuit. *PNAS* **101**: 15512–7
- Charlie NK, Schade MA, Thomure AM & Miller KG (2006) Presynaptic UNC-31 (CAPS) is required to activate the G alpha(s) pathway of the *Caenorhabditis elegans* synaptic signaling network. *Genetics* **172**: 943–61
- Chatzigeorgiou M & Schafer WR (2011) Lateral facilitation between primary mechanosensory neurons controls nose touch perception in *C. elegans*. *Neuron* **70**: 299–309
- Chatzigeorgiou M, Yoo S, Watson JD, Lee W-H, Spencer WC, Kindt KS, Hwang SW, Miller DM, Treinin M, Driscoll M & Schafer WR (2010) Specific roles for DEG/ENaC and TRP channels in touch and thermosensation in *C. elegans* nociceptors. *Nature neuroscience* **13**: 861–8
- Chekulaeva M & Filipowicz W (2009) Mechanisms of miRNA-mediated post-transcriptional regulation in animal cells. *Current opinion in cell biology* **21**: 452–60
- Chen N, Pai S, Zhao Z, Mah A, Newbury R, Johnsen RC, Altun Z, Moerman DG, Baillie DL & Stein LD (2005) Identification of a nematode chemosensory gene family. *PNAS* **102**: 146–51
- Chow BY, Han X, Dobry AS, Qian X, Chuong AS, Li M, Henninger MA, Belfort GM, Lin Y, Monahan PE & Boyden ES (2010) High-performance genetically targetable optical neural silencing by light-driven proton pumps. *Nature* **463**: 98–102
- Chronis N, Zimmer M & Bargmann C (2007) Microfluidics for in vivo imaging of neuronal and behavioral activity in *Caenorhabditis elegans*. *Nature methods* **4**: 727–31

- Colbert HA, Smith TL & Bargmann C (1997) OSM-9, a novel protein with structural similarity to channels, is required for olfaction, mechanosensation, and olfactory adaptation in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of neuroscience* **17**: 8259–69
- Coste B, Xiao B, Santos JS, Syeda R, Grandl J, Spencer KS, Kim SE, Schmidt M, Mathur J, Dubin AE, Montal M & Patapoutian A (2012) Piezo proteins are pore-forming subunits of mechanically activated channels. *Nature* **483**: 176–81
- Croll NA (1975) Behavioural analysis of nematode movement. *Advances in parasitology* **13**: 71–122
- Cueva JG, Mulholland A & Goodman M (2007) Nanoscale organization of the MEC-4 DEG/ENaC sensory mechanotransduction channel in *Caenorhabditis elegans* touch receptor neurons. *The Journal of neuroscience* **27**: 14089–98
- Davis MW, Morton JJ, Carroll D & Jorgensen EM (2008) Gene activation using FLP recombinase in *C. elegans*. *PLoS genetics* **4**: e1000028
- Deisseroth K (2011) Optogenetics. *Nature methods* **8**: 26–9
- Deisseroth K, Feng G, Majewska AK, Miesenböck G, Ting A & Schnitzer MJ (2006) Next-generation optical technologies for illuminating genetically targeted brain circuits. *The Journal of neuroscience* **26**: 10380–6
- Diester I, Kaufman MT, Mogri M, Pashaie R, Goo W, Yizhar O, Ramakrishnan C, Deisseroth K & Shenoy K V (2011) An optogenetic toolbox designed for primates. *Nature neuroscience* **14**: 387–97
- Donnelly JL, Clark CM, Leifer AM, Pirri JK, Haburcak M, Francis MM, Samuel ADT & Alkema MJ (2013) Monoaminergic Orchestration of Motor Programs in a Complex *C. elegans* Behavior. *PLoS Biology* **11**: e1001529
- Duerr JS, Frisby DL, Gaskin J, Duke A, Asermely K, Huddleston D, Eiden LE & Rand JB (1999) The cat-1 gene of *Caenorhabditis elegans* encodes a vesicular monoamine transporter required for specific monoamine-dependent behaviors. *The Journal of neuroscience* **19**: 72–84
- Dwyer ND, Troemel ER, Sengupta P & Bargmann C (1998) Odorant receptor localization to olfactory cilia is mediated by ODR-4, a novel membrane-associated protein. *Cell* **93**: 455–66
- Edwards SL, Charlie NK, Milfort MC, Brown BS, Gravlin CN, Knecht JE & Miller KG (2008) A novel molecular solution for ultraviolet light detection in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS biology* **6**: e198
- Esposito G, Amoroso MR, Bergamasco C, Di Schiavi E & Bazzicalupo P (2010) The G protein regulators EGL-10 and EAT-16, the G α GOA-1 and the G(q) α EGL-30 modulate the response of the *C. elegans* ASH polymodal nociceptive sensory neurons to repellents. *BMC biology* **8**: 138
- Esposito G, Di Schiavi E, Bergamasco C & Bazzicalupo P (2007) Efficient and cell specific knock-down of gene function in targeted *C. elegans* neurons. *Gene* **395**: 170–6
- Ezcurra M, Tanizawa Y, Swoboda P & Schafer WR (2011) Food sensitizes *C. elegans* avoidance behaviours through acute dopamine signalling. *The EMBO journal* **30**: 1110–22
- Feinberg EH & Hunter CP (2003) Transport of dsRNA into cells by the transmembrane protein SID-1. *Science* **301**: 1545–7
- Feldbauer K, Zimmermann D, Pintschovius V, Spitz J, Bamann C & Bamberg E (2009) Channelrhodopsin-2 is a leaky proton pump. *PNAS* **106**: 12317–22

- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE & Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**: 806–11
- Franks CJ, Pemberton D, Vinogradova I, Cook A, Walker RJ & Holden-Dye L (2002) Ionic basis of the resting membrane potential and action potential in the pharyngeal muscle of *Caenorhabditis elegans*. *Journal of neurophysiology* **87**: 954–61
- Fujiwara M, Sengupta P & McIntire SL (2002) Regulation of body size and behavioral state of *C. elegans* by sensory perception and the EGL-4 cGMP-dependent protein kinase. *Neuron* **36**: 1091–102
- Geffeney SL, Cueva JG, Glauser D a, Doll JC, Lee TH-C, Montoya M, Karania S, Garakani AM, Pruitt BL & Goodman M (2011) DEG/ENaC but not TRP channels are the major mechanoelectrical transduction channels in a *C. elegans* nociceptor. *Neuron* **71**: 845–57
- Geffeney SL & Goodman M (2012) How we feel: ion channel partnerships that detect mechanical inputs and give rise to touch and pain perception. *Neuron* **74**: 609–19
- Goodman M, Hall DH, Avery L & Lockery SR (1998) Active currents regulate sensitivity and dynamic range in *C. elegans* neurons. *Neuron* **20**: 763–72
- Goodman M & Schwarz EM (2003) Transducing touch in *Caenorhabditis elegans*. *Annual review of physiology* **65**: 429–52
- Göpfert MC, Albert JT, Nadrowski B & Kamikouchi A (2006) Specification of auditory sensitivity by *Drosophila* TRP channels. *Nature neuroscience* **9**: 999–1000
- Gradinaru V, Thompson KR & Deisseroth K (2008) eNpHR: a *Natronomonas halorhodopsin* enhanced for optogenetic applications. *Brain cell biology* **36**: 129–39
- Gradinaru V, Thompson KR, Zhang F, Mogri M, Kay K, Schneider MB & Deisseroth K (2007) Targeting and readout strategies for fast optical neural control *in vitro* and *in vivo*. *The Journal of neuroscience* **27**: 14231–8
- Gradinaru V, Zhang F, Ramakrishnan C, Mattis J, Prakash R, Diester I, Goshen I, Thompson KR & Deisseroth K (2010) Molecular and cellular approaches for diversifying and extending optogenetics. *Cell* **141**: 154–65
- Gray JM, Hill JJ & Bargmann C (2005) A circuit for navigation in *Caenorhabditis elegans*. *PNAS* **102**: 3184–91
- Gunaydin LA, Yizhar O, Berndt A, Sohal VS, Deisseroth K & Hegemann P (2010) Ultrafast optogenetic control. *Nature neuroscience* **13**: 387–92
- Guo Z V, Hart A & Ramanathan S (2009) Optical interrogation of neural circuits in *Caenorhabditis elegans*. *Nature methods* **6**: 891–6
- Hardie RC (2001) Phototransduction in *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Biol.* **204**: 3403–3409
- Harris G, Hapiak VM, Wragg RT, Miller SB, Hughes LJ, Hobson RJ, Steven R, Bamber B & Komuniecki RW (2009) Three distinct amine receptors operating at different levels within the locomotory circuit are each essential for the serotonergic modulation of chemosensation in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of neuroscience* **29**: 1446–56
- Harris G, Mills H, Wragg R, Hapiak V, Castelletto M, Korchnak A & Komuniecki RW (2010) The monoaminergic modulation of sensory-mediated aversive responses in *Caenorhabditis elegans* requires glutamatergic/peptidergic cotransmission. *The Journal of neuroscience* **30**: 7889–99

- Hart A & Chao MY (2010) From Odors to Behaviors in *Caenorhabditis elegans*. In *The Neurobiology of Olfaction*, A M (ed) CRC Press
- Hart A, Kass J, Shapiro JE & Kaplan JM (1999) Distinct signaling pathways mediate touch and osmosensory responses in a polymodal sensory neuron. *The Journal of neuroscience* **19**: 1952–8
- Haupts U, Tittor J, Bamberg E & Oesterhelt D (1997) General concept for ion translocation by halobacterial retinal proteins: the isomerization/switch/transfer (IST) model. *Biochemistry* **36**: 2–7
- Hilliard M, Apicella AJ, Kerr R, Suzuki H, Bazzicalupo P & Schafer WR (2005) In vivo imaging of *C. elegans* ASH neurons: cellular response and adaptation to chemical repellents. *The EMBO journal* **24**: 63–72
- Hilliard M, Bargmann C & Bazzicalupo P (2002) *C. elegans* responds to chemical repellents by integrating sensory inputs from the head and the tail. *Current biology* : *CB* **12**: 730–4
- Hilliard M, Bergamasco C, Arbucci S, Plasterk RHA & Bazzicalupo P (2004) Worms taste bitter: ASH neurons, QUI-1, GPA-3 and ODR-3 mediate quinine avoidance in *Caenorhabditis elegans*. *The EMBO journal* **23**: 1101–11
- Hillier LW, Coulson A, Murray JI, Bao Z, Sulston J & Waterston RH (2005) Genomics in *C. elegans*: so many genes, such a little worm. *Genome research* **15**: 1651–60
- Hobert O, Carrera I & Stefanakis N (2010) The molecular and gene regulatory signature of a neuron. *Trends in neurosciences* **33**: 435–45
- Horvitz HR, Chalfie M, Trent C, Sulston J & Evans PD (1982) Serotonin and octopamine in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science* **216**: 1012–4
- Huang M & Chalfie M (1994) Gene interactions affecting mechanosensory transduction in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **367**: 467–70
- Husson SJ, Clynen E, Baggerman G, Janssen T & Schoofs L (2006) Defective processing of neuropeptide precursors in *Caenorhabditis elegans* lacking proprotein convertase 2 (KPC-2/EGL-3): mutant analysis by mass spectrometry. *Journal of neurochemistry* **98**: 1999–2012
- Husson SJ, Costa WS, Schmitt C & Gottschalk A (2013a) Keeping track of worm trackers. *WormBook*: 1–17
- Husson SJ, Costa WS, Wabnig S, Stirman JN, Watson JD, Spencer WC, Akerboom J, Looger LL, Treinin M, Miller DM, Lu H & Gottschalk A (2012a) Optogenetic analysis of a nociceptor neuron and network reveals ion channels acting downstream of primary sensors. *Current biology* **22**: 743–52
- Husson SJ, Gottschalk A & Leifer AM (2013b) Optogenetic manipulation of neural activity in *C. elegans*: from synapse to circuits and behavior. *Biology of the cell*: 28
- Husson SJ, Liewald JF, Schultheis C, Stirman JN, Lu H & Gottschalk A (2012b) Microbial light-activatable proton pumps as neuronal inhibitors to functionally dissect neuronal networks in *C. elegans*. *PLoS one* **7**: e40937
- Ishizuka T, Kakuda M, Araki R & Yawo H (2006) Kinetic evaluation of photosensitivity in genetically engineered neurons expressing green algae light-gated channels. *Neuroscience research* **54**: 85–94

- Jansen G, Thijssen KL, Werner P, Van der Horst M, Hazendonk E & Plasterk RH (1999) The complete family of genes encoding G proteins of *Caenorhabditis elegans*. *Nature genetics* **21**: 414–9
- Jose AM & Hunter CP (2007) Transport of sequence-specific RNA interference information between cells. *Annual review of genetics* **41**: 305–30
- Kahn-Kirby AH & Bargmann C (2006) TRP channels in *C. elegans*. *Annual review of physiology* **68**: 719–36
- Kahn-Kirby AH, Dantzer JLM, Apicella AJ, Schafer WR, Browse J, Bargmann C & Watts JL (2004) Specific polyunsaturated fatty acids drive TRPV-dependent sensory signaling in vivo. *Cell* **119**: 889–900
- Kamath RS, Fraser AG, Dong Y, Poulin G, Durbin R, Gotta M, Kanapin A, Le Bot N, Moreno S, Sohrmann M, Welchman DP, Zipperlen P & Ahringer J (2003) Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature* **421**: 231–7
- Kaplan JM & Horvitz HR (1993) A dual mechanosensory and chemosensory neuron in *Caenorhabditis elegans*. *PNAS* **90**: 2227–31
- Kass J, Jacob TC, Kim P & Kaplan JM (2001) The EGL-3 proprotein convertase regulates mechanosensory responses of *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of neuroscience* **21**: 9265–72
- Kim K & Li C (2004) Expression and regulation of an FMRFamide-related neuropeptide gene family in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of comparative neurology* **475**: 540–50
- Kleinlogel S, Feldbauer K, Dempski RE, Fotis H, Wood PG, Bamann C & Bamberg E (2011) Ultra light-sensitive and fast neuronal activation with the Ca²⁺-permeable channelrhodopsin CatCh. *Nature neuroscience* **14**: 513–8
- Kouyama T, Kanada S, Takeguchi Y, Narusawa A, Murakami M & Ihara K (2010) Crystal structure of the light-driven chloride pump halorhodopsin from *Natronomonas pharaonis*. *Journal of molecular biology* **396**: 564–79
- Lackner MR, Nurrish SJ & Kaplan JM (1999) Facilitation of synaptic transmission by EGL-30 Gqalpha and EGL-8 PLCbeta: DAG binding to UNC-13 is required to stimulate acetylcholine release. *Neuron* **24**: 335–46
- Lans H, Rademakers S & Jansen G (2004) A network of stimulatory and inhibitory Galpha-subunits regulates olfaction in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **167**: 1677–87
- Lanyi JK & Oesterhelt D (1982) Identification of the retinal-binding protein in halorhodopsin. *The Journal of biological chemistry* **257**: 2674–7
- Lee RY, Lobel L, Hengartner M, Horvitz HR & Avery L (1997) Mutations in the alpha1 subunit of an L-type voltage-activated Ca²⁺ channel cause myotonia in *Caenorhabditis elegans*. *The EMBO journal* **16**: 6066–76
- Lee RY, Sawin ER, Chalfie M, Horvitz HR & Avery L (1999) EAT-4, a homolog of a mammalian sodium-dependent inorganic phosphate cotransporter, is necessary for glutamatergic neurotransmission in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of neuroscience* **19**: 159–67
- Leifer AM, Fang-Yen C, Gershow M, Alkema MJ & Samuel ADT (2011) Optogenetic manipulation of neural activity in freely moving *Caenorhabditis elegans*. *Nature methods* **8**: 147–52

- Levskaya A, Weiner OD, Lim WA & Voigt CA (2009) Spatiotemporal control of cell signalling using a light-switchable protein interaction. *Nature* **461**: 997–1001
- Li W, Kang L, Piggott BJ, Feng Z & Xu XZS (2011) The neural circuits and sensory channels mediating harsh touch sensation in *Caenorhabditis elegans*. *Nature communications* **2**: 315
- Liedtke W, Tobin DM, Bargmann C & Friedman JM (2003) Mammalian TRPV4 (VR-OAC) directs behavioral responses to osmotic and mechanical stimuli in *Caenorhabditis elegans*. *PNAS* **100**: 14531–6
- Liewald JF, Brauner M, Stephens GJ, Bouhours M, Schultheis C, Zhen M & Gottschalk A (2008) Optogenetic analysis of synaptic function. **5**: 895–902
- Lin JY, Lin MZ, Steinbach P & Tsien RY (2009) Characterization of engineered channelrhodopsin variants with improved properties and kinetics. *Biophysical journal* **96**: 1803–14
- Liu Q, Hollopeter G & Jorgensen EM (2009) Graded synaptic transmission at the *Caenorhabditis elegans* neuromuscular junction. *PNAS* **106**: 10823–8
- Van Loy T, Vandersmissen HP, Poels J, Van Hiel MB, Verlinden H & Vanden Broeck J (2010) Tachykinin-related peptides and their receptors in invertebrates: a current view. *Peptides* **31**: 520–4
- Macosko EZ, Pokala N, Feinberg EH, Chalasani SH, Butcher RA, Clardy J & Bargmann C (2009) A hub-and-spoke circuit drives pheromone attraction and social behaviour in *C. elegans*. *Nature* **458**: 1171–5
- Maduro MF, Gordon M, Jacobs R & Pilgrim DB (2000) The UNC-119 family of neural proteins is functionally conserved between humans, *Drosophila* and *C. elegans*. *Journal of neurogenetics* **13**: 191–212
- Mains R & Eipper B (1999) The Neuropeptides. In *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects.*, Siegel G Agranoff B & Albers R (eds) Philadelphia: Lippincott-Raven
- Mellem JE, Brockie PJ, Zheng Y, Madsen DM & Maricq A V (2002) Decoding of polymodal sensory stimuli by postsynaptic glutamate receptors in *C. elegans*. *Neuron* **36**: 933–44
- Mills H, Wragg R, Hapiak V, Castelletto M, Zahratka J, Harris G, Summers P, Korchnak A, Law W, Bamber B & Komuniecki R (2012) Monoamines and neuropeptides interact to inhibit aversive behaviour in *Caenorhabditis elegans*. *The EMBO journal* **31**: 667–78
- Moazed D (2009) Small RNAs in transcriptional gene silencing and genome defence. *Nature* **457**: 413–20
- Nagel G, Brauner M, Liewald JF, Adeishvili N, Bamberg E & Gottschalk A (2005) Light activation of channelrhodopsin-2 in excitable cells of *Caenorhabditis elegans* triggers rapid behavioral responses. *Current biology* **15**: 2279–84
- Nagel G, Ollig D, Fuhrmann M, Kateriya S, Musti AM, Bamberg E & Hegemann P (2002) Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae. *Science* **296**: 2395–8
- Nagel G, Szellas T, Huhn W, Kateriya S, Adeishvili N, Berthold P, Ollig D, Hegemann P & Bamberg E (2003) Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *PNAS* **100**: 13940–5
- Nathoo AN, Moeller RA, Westlund BA & Hart A (2001) Identification of neuropeptide-like protein gene families in *Caenorhabditis elegans* and other species. *PNAS* **98**: 14000–5

- Niacaris T & Avery L (2003) Serotonin regulates repolarization of the *C. elegans* pharyngeal muscle. *The Journal of experimental biology* **206**: 223–31
- Nilius B & Owsianik G (2011) The transient receptor potential family of ion channels. *Genome biology* **12**: 218
- O'Hagan R, Chalfie M & Goodman M (2005) The MEC-4 DEG/ENaC channel of *Caenorhabditis elegans* touch receptor neurons transduces mechanical signals. *Nature neuroscience* **8**: 43–50
- Pavelec DM, Lachowiec J, Duchaine TF, Smith HE & Kennedy S (2009) Requirement for the ERI/DICER complex in endogenous RNA interference and sperm development in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **183**: 1283–95
- Pierce-Shimomura JT, Morse TM & Lockery SR (1999) The fundamental role of pirouettes in *Caenorhabditis elegans* chemotaxis. *The Journal of neuroscience* **19**: 9557–69
- Piggott BJ, Liu J, Feng Z, Wescott S a & Xu XZS (2011) The neural circuits and synaptic mechanisms underlying motor initiation in *C. elegans*. *Cell* **147**: 922–33
- Ramot D, Johnson BE, Berry TL, Carnell L & Goodman M (2008) The Parallel Worm Tracker: a platform for measuring average speed and drug-induced paralysis in nematodes. *PloS one* **3**: e2208
- Ranganathan R, Sawin ER, Trent C & Horvitz HR (2001) Mutations in the *Caenorhabditis elegans* serotonin reuptake transporter MOD-5 reveal serotonin-dependent and -independent activities of fluoxetine. *The Journal of neuroscience* **21**: 5871–84
- Reiner D, Weinshenker D & Thomas JH (1995) Analysis of dominant mutations affecting muscle excitation in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **141**: 961–76
- Reiner D, Weinshenker D, Tian H, Thomas JH, Nishiwaki K, Miwa J, Gruninger T, Leboeuf B & Garcia LR (2006) Behavioral genetics of *Caenorhabditis elegans* unc-103-encoded erg-like K(+) channel. *Journal of neurogenetics* **20**: 41–66
- Renden R, Berwin B, Davis W, Ann K, Chin CT, Kreber R, Ganetzky B, Martin TF & Broadie K (2001) *Drosophila* CAPS is an essential gene that regulates dense-core vesicle release and synaptic vesicle fusion. *Neuron* **31**: 421–37
- Richmond JE, Davis WS & Jorgensen EM (1999) UNC-13 is required for synaptic vesicle fusion in *C. elegans*. *Nature neuroscience* **2**: 959–64
- Roayaie K, Crump JG, Sagasti A & Bargmann C (1998) The G alpha protein ODR-3 mediates olfactory and nociceptive function and controls cilium morphogenesis in *C. elegans* olfactory neurons. *Neuron* **20**: 55–67
- Rogers C, Reale V, Kim K, Chatwin H, Li C, Evans P & De Bono M (2003) Inhibition of *Caenorhabditis elegans* social feeding by FMRFamide-related peptide activation of NPR-1. *Nature neuroscience* **6**: 1178–85
- Rual J-F, Ceron J, Koreth J, Hao T, Nicot A-S, Hirozane-Kishikawa T, Vandenhoute J, Orkin SH, Hill DE, Van den Heuvel S & Vidal M (2004) Toward improving *Caenorhabditis elegans* phenome mapping with an ORFeome-based RNAi library. *Genome research* **14**: 2162–8
- Ryu M-H, Moskvina O V, Siltberg-Liberles J & Gomelsky M (2010) Natural and engineered photoactivated nucleotidyl cyclases for optogenetic applications. *The Journal of biological chemistry* **285**: 41501–8

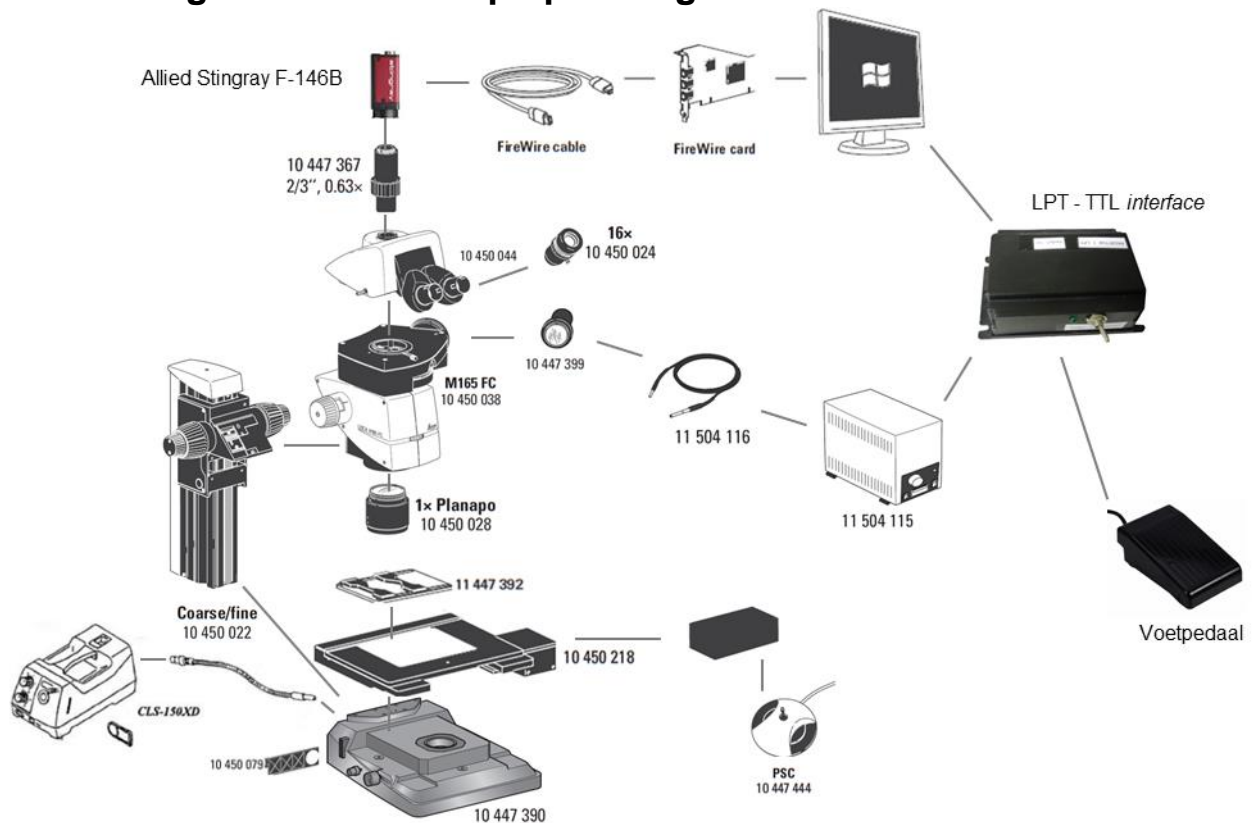
- Sawin ER, Ranganathan R & Horvitz HR (2000) *C. elegans* locomotory rate is modulated by the environment through a dopaminergic pathway and by experience through a serotonergic pathway. *Neuron* **26**: 619–31
- Schafer WR & Kenyon CJ (1995) A calcium-channel homologue required for adaptation to dopamine and serotonin in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **375**: 73–8
- Schmitt C, Schultheis C, Husson SJ, Liewald JF & Gottschalk A (2012) Specific expression of channelrhodopsin-2 in single neurons of *Caenorhabditis elegans*. *PLoS one* **7**: e43164
- Schoenenberger P, Gerosa D & Oertner TG (2009) Temporal control of immediate early gene induction by light. *PLoS one* **4**: e8185
- Schultheis C, Liewald JF, Bamberg E, Nagel G & Gottschalk A (2011) Optogenetic long-term manipulation of behavior and animal development. *PLoS one* **6**: e18766
- Shih JD & Hunter CP (2011) SID-1 is a dsRNA-selective dsRNA-gated channel. *RNA* **17**: 1057–65
- Speese S, Petrie M, Schuske K, Ailion M, Ann K, Iwasaki K, Jorgensen EM & Martin TFJ (2007) UNC-31 (CAPS) is required for dense-core vesicle but not synaptic vesicle exocytosis in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of neuroscience* **27**: 6150–62
- Stehfest K & Hegemann P (2010) Evolution of the channelrhodopsin photocycle model. *Chemphyschem: a European journal of chemical physics and physical chemistry* **11**: 1120–6
- Stierl M, Stumpf P, Udvari D, Gueta R, Hagedorn R, Losi A, Gärtner W, Petereit L, Efetova M, Schwarzel M, Oertner TG, Nagel G & Hegemann P (2011) Light modulation of cellular cAMP by a small bacterial photoactivated adenylyl cyclase, bPAC, of the soil bacterium *Beggiatoa*. *The Journal of biological chemistry* **286**: 1181–8
- Stiernagle T (2006) Maintenance of *C. elegans*. *WormBook*: 1–11
- Stirman JN, Crane MM, Husson SJ, Gottschalk A & Lu H (2012) A multispectral optical illumination system with precise spatiotemporal control for the manipulation of optogenetic reagents. *Nature protocols* **7**: 207–20
- Stirman JN, Crane MM, Husson SJ, Wabnig S, Schultheis C, Gottschalk A & Lu H (2011) Real-time multimodal optical control of neurons and muscles in freely behaving *Caenorhabditis elegans*. *Nature methods* **8**: 153–8
- Sugiura M, Fuke S, Suo S, Sasagawa N, Van Tol HHM & Ishiura S (2005) Characterization of a novel D2-like dopamine receptor with a truncated splice variant and a D1-like dopamine receptor unique to invertebrates from *Caenorhabditis elegans*. *Journal of neurochemistry* **94**: 1146–57
- Sulston J & Horvitz HR (1977) Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Developmental biology* **56**: 110–56
- Suo S, Culotti JG & Van Tol HHM (2009) Dopamine counteracts octopamine signalling in a neural circuit mediating food response in *C. elegans*. *The EMBO journal* **28**: 2437–48
- Sze JY, Victor M, Loer C, Shi Y & Ruvkun G (2000) Food and metabolic signalling defects in a *Caenorhabditis elegans* serotonin-synthesis mutant. *Nature* **403**: 560–4
- Timmons L, Court DL & Fire A (2001) Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene* **263**: 103–12
- Timmons L & Fire A (1998) Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* **395**: 854

- Tobin D, Madsen D, Kahn-Kirby A, Peckol E, Moulder G, Barstead R, Maricq A & Bargmann C (2002) Combinatorial expression of TRPV channel proteins defines their sensory functions and subcellular localization in *C. elegans* neurons. *Neuron* **35**: 307–18
- Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI & Julius D (1998) The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* **21**: 531–43
- Troemel ER, Chou JH, Dwyer ND, Colbert HA & Bargmann C (1995) Divergent seven transmembrane receptors are candidate chemosensory receptors in *C. elegans*. *Cell* **83**: 207–18
- Tsai H-C, Zhang F, Adamantidis A, Stuber GD, Bonci A, De Lecea L & Deisseroth K (2009) Phasic firing in dopaminergic neurons is sufficient for behavioral conditioning. *Science* **324**: 1080–4
- Tsalik EL & Hobert O (2003) Functional mapping of neurons that control locomotory behavior in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of neurobiology* **56**: 178–97
- Tsunoda SP & Hegemann P (2009) Glu 87 of channelrhodopsin-1 causes pH-dependent color tuning and fast photocurrent inactivation. *Photochemistry and photobiology* **85**: 564–9
- Tye KM, Prakash R, Kim S-Y, Fenno LE, Grosenick L, Zarabi H, Thompson KR, Gradinaru V, Ramakrishnan C & Deisseroth K (2011) Amygdala circuitry mediating reversible and bidirectional control of anxiety. *Nature* **471**: 358–62
- Voglis G & Tavernarakis N (2008) A synaptic DEG/ENaC ion channel mediates learning in *C. elegans* by facilitating dopamine signalling. *The EMBO journal* **27**: 3288–99
- Walters ET & Moroz LL (2009) Molluscan memory of injury: evolutionary insights into chronic pain and neurological disorders. *Brain, behavior and evolution* **74**: 206–18
- Wang H, Sugiyama Y, Hikima T, Sugano E, Tomita H, Takahashi T, Ishizuka T & Yawo H (2009) Molecular determinants differentiating photocurrent properties of two channelrhodopsins from *Chlamydomonas*. *The Journal of biological chemistry* **284**: 5685–96
- Way JC & Chalfie M (1989) The *mec-3* gene of *Caenorhabditis elegans* requires its own product for maintained expression and is expressed in three neuronal cell types. *Genes & development* **3**: 1823–33
- White JG, Southgate E, Thomson JN & Brenner S (1986) The Structure of the Nervous System of the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Philosophical Transactions of the Royal Society* **314**: 1–340
- Wicks SR & Rankin CH (1995) Integration of mechanosensory stimuli in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of neuroscience* **15**: 2434–44
- Winston WM, Molodowitch C & Hunter CP (2002) Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1. *Science* **295**: 2456–9
- Winston WM, Sutherlin M, Wright AJ, Feinberg EH & Hunter CP (2007) *Caenorhabditis elegans* SID-2 is required for environmental RNA interference. *PNAS* **104**: 10565–70
- Wragg RT, Hapiak V, Miller SB, Harris G, Gray J, Komuniecki PR & Komuniecki RW (2007) Tyramine and octopamine independently inhibit serotonin-stimulated aversive behaviors in *Caenorhabditis elegans* through two novel amine receptors. *The Journal of neuroscience* **27**: 13402–12
- Wu YI, Wang X, He L, Montell D & Hahn KM (2011) Spatiotemporal control of small GTPases with light using the LOV domain. *Methods in enzymology* **497**: 393–407

- Xu C & Min J (2011) Structure and function of WD40 domain proteins. *Protein & cell* **2**: 202–14
- Xu X & Kim SK (2011) The early bird catches the worm: new technologies for the *Caenorhabditis elegans* toolkit. *Nature reviews. Genetics* **12**: 793–801
- Yigit E, Batista PJ, Bei Y, Pang KM, Chen C-CG, Tolia NH, Joshua-Tor L, Mitani S, Simard MJ & Mello CC (2006) Analysis of the *C. elegans* Argonaute family reveals that distinct Argonautes act sequentially during RNAi. *Cell* **127**: 747–57
- Yizhar O, Fenno L, Zhang F, Hegemann P & Deisseroth K (2011a) Microbial opsins: a family of single-component tools for optical control of neural activity. *Cold Spring Harbor protocols* **2011**: top102
- Yizhar O, Fenno LE, Davidson TJ, Mogri M & Deisseroth K (2011b) Optogenetics in neural systems. *Neuron* **71**: 9–34
- Yoshitsugu M, Yamada J & Kandori H (2009) Color-changing mutation in the E-F loop of photohodopsin. *Biochemistry* **48**: 4324–30
- Zemelman B V, Lee GA, Ng M & Miesenböck G (2002) Selective photostimulation of genetically chARGed neurons. *Neuron* **33**: 15–22]
- Zhang F, Prigge M, Beyrière F, Tsunoda SP, Mattis J, Yizhar O, Hegemann P & Deisseroth K (2008) Red-shifted optogenetic excitation: a tool for fast neural control derived from *Volvox carteri*. *Nature neuroscience* **11**: 631–3
- Zhang F, Wang L-P, Boyden ES & Deisseroth K (2006) Channelrhodopsin-2 and optical control of excitable cells. *Nature methods* **3**: 785–92
- Zhang F, Wang L-P, Brauner M, Liewald JF, Kay K, Watzke N, Wood PG, Bamberg E, Nagel G, Gottschalk A & Deisseroth K (2007) Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry. *Nature* **446**: 633–9
- Zhang S, Sokolchik I, Blanco G & Sze JY (2004) *Caenorhabditis elegans* TRPV ion channel regulates 5-HT biosynthesis in chemosensory neurons. *Development* **131**: 1629–38
- Zhao S, Cunha C, Zhang F, Liu Q, Gloss B, Deisseroth K, Augustine GJ & Feng G (2008) Improved expression of halorhodopsin for light-induced silencing of neuronal activity. *Brain cell biology* **36**: 141–54
- Zheng Y, Brockie PJ, Mellem JE, Madsen DM & Maricq A V (1999) Neuronal control of locomotion in *C. elegans* is modified by a dominant mutation in the GLR-1 ionotropic glutamate receptor. *Neuron* **24**: 347–61
- Zhou K-M, Dong Y-M, Ge Q, Zhu D, Zhou W, Lin X-G, Liang T, Wu Z-X & Xu T (2007) PKA activation bypasses the requirement for UNC-31 in the docking of dense core vesicles from *C. elegans* neurons. *Neuron* **56**: 657–69

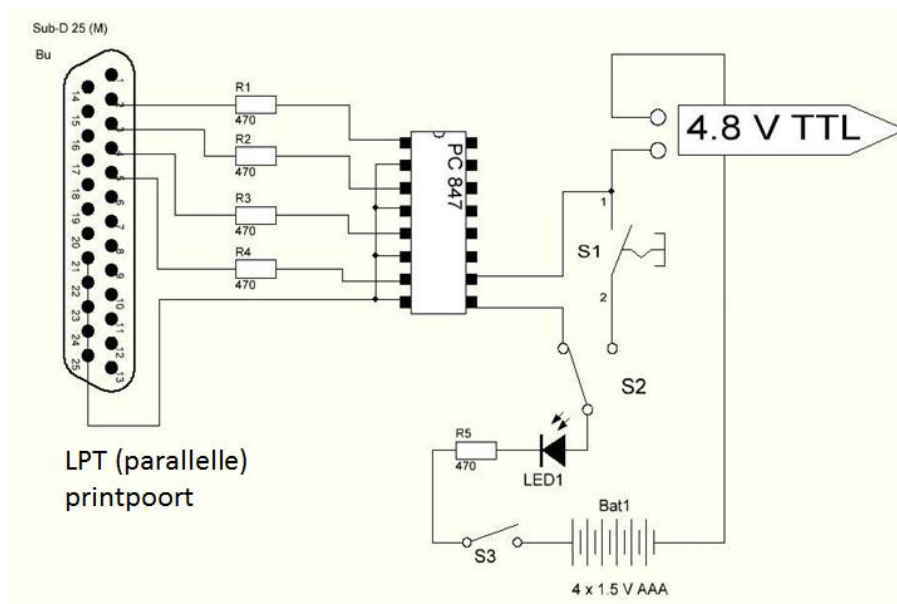
Deel III
Addendum

A1. Extra figuren microscoop opstelling



Figuur A1: Technische data van het optogenetisch gedragsplatform voor *whole-field* illuminatie van *C. elegans* en automatische gedragsanalyse door middel van *video-tracking* technologie. Deze afbeelding is complementair aan figuur 7.

Allied Stingray F-146B camera
Leica 10 447 367 0.63x videotube
Leica 10 450 044 trinoculaire tubus naar keuze video-/fototube 100%, 5°–45° kijkhoek
Leica 10 450 038 M165 FC, 16.5:1 zoom, apochromatisch gecorrigeerd, derde lichtbaan TripleBeam™, geïntegreerd filtersysteem FLUOIII™: Filtersnelwisselaar voor 4 filtersets naar keuze (Leica 10 447 407 Filterset GFP2 + dummy's) manuele UV shutter, UV-lichtscherm met arm, manuele dubbele iris diafragma
Leica 10 450 024 Wide-field oculair 16x/15, dioptrische correctie, met eyecups
Leica 10 450 028 1.0x planapochromatisch objectief
Leica 10 450 022 Focalisatie-instelwiel, coarse/fine, met 420mm profile column
Leica 10 447 392 Universele objectplaat voor petriplaten en objectglaasjes
Leica 10 450 218 IsoPro™ geautomatiseerde microscoopvoet (motorized mechanical stage) voor TL RC™ doorvallend-lichtbasis
Leica 10 447 444 PSC controle unit voor IsoPro™ + X/Y Stage DCI module (data converter interface)
Leica 10 447 390 doorvallend-lichtbasis TL RC™ + Leica 10 447 393 ND filter (neutral density filter)
Leica 30 111 480 CLS150XD MED (100-240 V) externe koude lichtbron
Leica 11 504 115 EL6000 externe lichtbron voor fluorescentie + Leica 11 504 116 optische vezel
Leica 10 447 395 koppeling 11 504 116 Leica optische vezel afkomstig van EL6000



Figuur A2: Schema van het elektrische circuit voor de LPT - TTL interface. Het TTL (*Transistor-Transistor Logic*) signaal dat doorheen de LPT (*parallelle, Line Print Terminal*) printpoort wordt uitgezonden, activeert de PC 847 optocoupler, dat op zijn beurt een TTL signaal uitzendt (4.8 V, 13 mA TTL). Hierdoor worden de signalen afkomstig van de computer naar het circuit van de sluiters overgedragen zonder dat beide schakelingen elektronisch verbonden zijn. Het schema toont ook drie LPT pins (2, 3 en 4) die aan de optocoupler zijn verbonden. In deze opstelling werden deze verbindingen echter niet gemaakt aangezien ze gebruikt kunnen worden voor bijkomende TTL *outputs*. Via schakelaar S2 (ook door pijl 7 in figuur 7 aangeduid) kan men tussen het voetpedaal (S1) of computergestuurde pulsen kiezen. In beide gevallen zal het LED lampje op de EL6000 lichtbron (pijl 13 in figuur 7) pas oplichten als het TTL signaal wordt uitgezonden en het specimen dus belicht wordt. Een gedetailleerd overzicht van alle componenten van het elektronisch circuit is in de handleiding van de OptoTracker terug te vinden (<http://www.biochem.uni-frankfurt.de/index.php?id=236>).

A2. Gebruikte *C. elegans* stammen

AQ2235	<i>lite-1(ce314) X; ljls114[Pgpa-13::FLPase, Psra-6::FTF::ChR2::YFP]</i>
TU3401	<i>sid-1(pk3321) V; uls69 [pCFJ90(Pmyo-2::mCherry) + Punc-119::sid-1] V</i>
LSC501	<i>sid-1(pk3321) V; uls69 [pCFJ90(Pmyo-2::mCherry) + Punc-119::sid-1] V; ljls114[Pgpa-13::FLPase, Psra-6::FTF::ChR2::YFP]</i>
RB1423	<i>C49A9.7(ok1620) IV</i>
LSC592	<i>C49A9.7(ok1620) IV; ljls114[Pgpa-13::FLPase, Psra-6::FTF::ChR2::YFP]</i>
NL5901	<i>pkls2386[Punc-54::alphasynuclein::YFP]</i>
ZX819	<i>lite-1(ce314) X; zxls12[pF49H12.4::ChR2::mCherry; pF49H12.4::GFP]</i>

A3. Gebruikte internetlinks

OptoTracker: De scripts van de OptoTracker zijn samen met een uitgebreide handleiding vrij te downloaden op de website van de Gottschalk onderzoeksgroep. <http://www.biochem.uni-frankfurt.de/index.php?id=236>

VirtualDub: Voor de conversie van de individuele frames van opnames tot binaire zwart-wit beelden wordt gebruik gemaakt van de vrij downloadbare VirtualDub videobewerkingssoftware. <http://virtualdub.sourceforge.net/>

ImageJ: Gratis downloadbare software gebruikt voor de meting van fluorescentie-intensiteiten op confocale projecties. <http://rsb.info.nih.gov/ij/>

WormBook: een *open-access* collectie van originele artikels omtrent de biologie en biochemie van de bodemnematode *C. elegans*. Bovendien bezit de internetsite een uitgebreide *WormMethod* sectie die verschillende protocollen en methoden voor *C. elegans* onderzoek omvat. www.wormbook.org

WormBase: Bio-informatische databank die naast het gesequencede genoom alle gepubliceerde informatie omtrent *C. elegans* biologie en genetica compileert. Ook vindt men er informatie omtrent gerelateerde nematoden. www.wormbase.org

WormAtlas: Een databank voor de structurele anatomie en het gedrag van *C. elegans*. www.wormatlas.org

Internetlinks voor de twee commercieel beschikbare RNAi *feeding* bibliotheken:

- Ahringer gDNA-RNAi bibliotheek: <http://www.gurdon.cam.ac.uk/~ahringerlab/pages/rnai.html>
- Vidal ORF-RNAi bibliotheek: <http://www.lifesciences.sourcebioscience.com/clone-products/mirna--rna-resources/c-elegans-orf-rnai-library-v11/c-elegans-orf-rnai-library.aspx>

Caenorhabditis Genetics Center (CGC): het *C. elegans* stock-center van de University of Minnesota waar men *C. elegans* en *E. coli* stammen kan aankopen. <http://www.cbs.umn.edu/cgc>

PubMed: een vrij toegankelijke zoekrobot die een databank met referenties naar *life-science* publicaties en boeken doorzoekt. Naast een abstract krijgt men per zoekresultaat een internetlink naar het complete artikel te zien. De schatting van het aantal publicaties dat gebruik maakt van optogenetische technieken voor neurobiologisch *C. elegans* onderzoek,

werd uitgevoerd door de PubMed databank met de termen “*elegans*” AND “optogenetic” te doorzoeken (op 22 mei 2013). www.pubmed.org

OpenWorm: een open-source project dat tracht een gedetailleerd computationeel model van *C. elegans* te creëren. Zo kan men via de *NeuroML Connectome* applicatie zelf binnen een driedimensionale reconstructie van het *C. elegans* zenuwstelsel navigeren. www.openworm.org

A4. Videofragmenten

Deze videofragmenten zijn op bijgeleverde cd terug te vinden, alsook online te bekijken. <https://www.dropbox.com/sh/4023rtx4tpsboqy/s1cvFTtV9>

Video 1: Na lichte mechanische stimulatie van de neus van WT wormen (bijvoorbeeld met een wimper), wordt een omkering geïnitieerd die vaak door een *omega bend* wordt gevolgd. Drie mechanosensorische neuronparen (ASH, FLP en OLQ) zijn hoofdzakelijk verantwoordelijk voor de detectie van deze stimulus en werken dan ook in parallel (Kaplan & Horvitz, 1993). Op het filmpje is te zien hoe neusaanraking een lange achterwaartse beweging initieert, waarna een bruuske draaibeweging langs ventrale zijde de *omega bend* inzet. Filmfragment uit Donnelly *et al.* (2013).

Video 2: ASH-specifieke expressie van het ChR2::YFP construct in AQ2235 wormen werd nagegaan door confocale *imaging*. Hiervoor werden optische secties (*Z-stacks*) van de hoofdregio gemaakt. Zo wordt YFP in het ASH neuronpaar tot expressie gebracht terwijl mCherry zowel in de ASI zenuwcellen als in de uitlopers van de PVQ neuronen zichtbaar is. De gestippelde witte cirkel geeft de locatie van de *terminal bulb* weer.

Video 3: Door confocale imaging kan de subcellulaire lokalisatie van de ChR2::YFP eiwitten in de ASH nociceptor nagegaan worden. Hiervoor werden optische secties (*Z-stacks*) van het helderste ASH neuron gemaakt. YFP fluorescentie is uniform over het plasmamembraan van het cellichaam zichtbaar.

Video 4 en **Video 5:** De gedragsrespons uitgelokt na *whole-field* illuminatie van transgene wormen met ASH-specifieke ChR2 expressie lijkt sterk op de vermijdingsrespons voor natuurlijke stimuli. De ChR2 bemiddelde fotoactivatie vindt wel onafhankelijk van de natuurlijke stimulus plaats, waardoor andere sensorische zenuwcellen niet tot het resulterend gedrag bijdragen. Bij belichting van *sid-1;ASH::ChR2* wormen stijgt de kans op het uitvoeren van een *omega bend* bij toenemende lichtintensiteit. Het blauwe licht dat op het videofragment tijdens de belichting te zien is, werd met videobewerkingssoftware op de *grayscale* videobeelden aangebracht.

Video 6: In de initiële *tracking*-experimenten waarbij verschillende OptoTracker-parameters werden ingesteld, werd ook een lijn gebruikt met PVD-specifieke ChR2 expressie (*lite-1(ce314)* wormen met het geïntegreerde transgen *zxls12[pF49H12.4::ChR2::mCherry; pF49H12.4::GFP]*). PVD detecteert grote mechanische krachten die op het volledige nematodenlichaam inwerken, waarna het een snelle voorwaartse vermijdingsrespons initieert. Dit gedrag kan men in de transgene wormen nabootsen door illuminatie met blauw licht. Het blauwe licht dat op het videofragment tijdens de belichting te zien is, werd met videobewerkingssoftware op de *grayscale* videobeelden aangebracht.

Video 7: Om snel visueel na te gaan of de RNAi reacties zijn opgegaan, worden ook HT115 bacteriën die de L4440/*unc-22* RNAi vector bezitten aan de wormen gevoed. Het *unc-22* gen codeert voor een groot intracellulair eiwit verantwoordelijk voor het in stand houden van de normale spiermorfologie. Knockdown van dit gen resulteert in een duidelijk *twitching* fenotype; de wormen zijn niet alleen trager maar maken ook continu schokkende bewegingen.

A5. Risicoanalyse

Vooraleer met het praktisch werk van deze masterproef van start te gaan, werd het draaiboek met de algemene richtlijnen van de Afdeling Dierenfysiologie en Neurobiologie grondig gelezen en ondertekend. Ook werd het correct gebruik van de apparaten (centrifuges, elektroforesetoestellen,...) steeds door begeleider of verantwoordelijke gedemonstreerd. Algemeen dient men steeds enkele basisregels na te volgen wanneer men in het laboratorium werkt. Zo zijn labojassen en labohandschoenen verplicht in de labo's te dragen maar worden deze uitgetrokken in bureau en koffielokaal. Ook is het consumeren van voedsel en drankwaren in de laboratoriumomgeving verboden. Handen moeten gewassen worden alvorens het labo te verlaten (met desinfecterende zeep) en telkens als dit nodig blijkt.

Hieronder staat een beknopt overzicht van de schadelijke reagentia en mogelijke gevaren tijdens het praktisch werk van deze masterproef. Vaak wordt de exacte samenstelling van de gebruikte reagentia niet in de aangekochte kits uiteengezet. Het bijhorende protocol vermeldt dan wel de voorzorgsmaatregelen die men moet treffen tijdens het gebruik van de kit.

- Worm kweek
 - NGM plaatjes (*nematode growth medium*)
 - Cholesterol
 - H302: Schadelijk bij inslikken.
 - Ethanol
 - H225: Licht ontvlambare vloeistof en damp.
 - P233: In goed gesloten verpakking bewaren.
 - Fungizone®: Amphotericin B

- H315: Veroorzaakt huidirritatie.
 - H319: Veroorzaakt ernstige oogirritatie.
 - H335: Kan irritatie van de luchtwegen veroorzaken.
- Nystatine
 - S22: Stof niet inademen.
 - S24/25: Aanraking met de ogen en de huid vermijden.
- Ampicilline natrium zout
 - H334: Kan bij inademing allergie- of astmasymptomen of ademhalingsmoeilijkheden veroorzaken.
 - H317: Kan een allergische huidreactie veroorzaken.
 - P285: Bij ontoereikende ventilatie een geschikte adembescherming dragen.
- Worm PCR
 - Proteïnase K
 - H319: Veroorzaakt ernstige oogirritatie.
 - H335: Kan irritatie van de luchtwegen veroorzaken.
 - H315: Veroorzaakt huidirritatie.
 - H334: Kan bij inademing allergie- of astmasymptomen of ademhalingsmoeilijkheden veroorzaken.
- Agarose Gel elektroforese (AGE) wordt steevast in het daarvoor bestemde lokaal uitgevoerd. Handschoenen worden bij het verlaten van dit lokaal ook weggegooid om contaminatie met de gebruikte fluorescente stoffen te vermijden.
 - Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethaan)
 - H319: Veroorzaakt ernstige oogirritatie.
 - H335: Kan irritatie van de luchtwegen veroorzaken.
 - H315: Veroorzaakt huidirritatie.
 - Azijnzuur
 - H226: Ontvlambare vloeistof en damp.
 - H314: Veroorzaakt ernstige brandwonden en oogletsel.
 - P233: In goed gesloten verpakking bewaren.
 - EDTA (Ethyleen diamine tetra-azijnzuur)
 - H319: Veroorzaakt ernstige oogirritatie. R36/37/38: Irriterend voor de ogen, de ademhalingswegen en de huid
 - P305+P351+P338: Bij contact met de ogen: afspoelen met water gedurende een aantal minuten; contactlenzen verwijderen, indien mogelijk; blijven spoelen.
 - Het elektroforese toestel wordt steeds volgens de veiligheidsvoorschriften van de fabrikant gebruikt en bijzondere aandacht wordt besteed aan het correct inschakelen van de stroombron.
 - GelRed™ wordt gebruikt om DNA bandjes na AGE te visualiseren, en wordt voor het stollen van de gel aan het mengsel gevoegd.
 - H341: Kan genetische schade veroorzaken.
 - R68: Onherstelbare effecten zijn niet uitgesloten.
- DNA sequentieanalyse
 - EDTA
 - Ethanol
- Optogenetische experimenten
 - (All-trans) retinal
 - H302: Schadelijk bij inslikken.
- Confocale preparaten
 - Natriumazide, NaN₃
 - H300: Dodelijk bij inslikken.
 - H410: Zeer giftig voor in het water levende organismen, met langdurige gevolgen.

- Microscopen (optogenetisch gedragsplatform en confocale microscoop): om oogschade te vermijden worden de lichtbronnen steevast volgens de handleiding van de fabrikant gemanipuleerd. De optische vezel met het hoog energetische licht wordt ook nooit van haar microscoophouder ontkoppeld wanneer het toestel is ingeschakeld.
- Bleaching
 - Natriumhydroxyde, NaOH
 - H290: Kan bijtend zijn voor metalen.
 - H314: Veroorzaakt ernstige brandwonden en oogletsel.
 - Natriumhypochloriet, NaOCl
 - H200: Instabiele ontplofbare stof.
 - H272: Kan brand bevorderen; oxiderend.
 - H314: Veroorzaakt ernstige brandwonden en oogletsel.
 - H335: Kan irritatie van de luchtwegen veroorzaken.
 - H400: Zeer giftig voor in het water levende organismen.

Biologische agentia:

Alle laboratoriumlokalen van de *C. elegans* onderzoeksgroep vallen onder het inperkingsniveau 1 (L1). Om contaminatie van staal en laboratoriumruimte te vermijden, werkt men zoveel mogelijk in laminaire flow trekkasten waar alle gebruikte materiaal met ethanol en vlam wordt gesteriliseerd. Na het morsen wordt het werkoppervlak (zowel *benches* als trekkasten) onmiddellijk met 70% ethanol schoon gemaakt, alsook na het beëindigen van de labo-activiteiten.

- OP50 en HT115 *E. coli* cellen: deze bacteriestammen werden ontwikkeld zodat deze alleen in een laboratoriumomgeving kunnen overleven.
- Transgene *C. elegans* lijnen: genetisch gemodificeerde wormen worden in deze studie gebruikt maar vormen geen gevaar voor de onderzoekers of het milieu. *C. elegans* is niet pathogeen of infecterend voor mensen.

Al het biologisch afval, alsook materiaal dat in aanraking is geweest met genetisch gemodificeerde organismen, wordt verzameld in breukvaste, lekdichte containers die gesloten kunnen worden (*cordi*-dozen en gele vaten). Deze containers worden wekelijks door een gespecialiseerde dienst afgevoerd.

AFDELING DIERENFYSIOLOGIE EN NEUROBIOLOGIE

Naamsestraat 59 bus 2465
3000 LEUVEN, BELGIË
tel. + 32 16 324260
fax + 32 16 323902
liliane.schoofs@bio.kuleuven.be
<http://bio.kuleuven.be/df/ls/>

