



Optogenetik: Eine neue Methodik zur kausalen Analyse neuronaler Netzwerke *in vivo*

Albrecht Stroh und Ilka Diester

Zusammenfassung

Die kausale Analyse neuronaler Netzwerke bedarf einer selektiven Manipulation neuronaler Subpopulationen im intakten Organismus. Optogenetik ist eine maßgeschneiderte Methode genau für diese Anforderungen. Hier stellen wir die Methode der Optogenetik vor und zeigen exemplarische Anwendungen in den Neurowissenschaften. Lichtsensitive Transmembrankanäle und lichtgetriebene Ionenpumpen, die komplett genetisch kodiert werden und ohne exogene Kofaktoren funktionell sind, bilden die Basis der Optogenetik. Mittels viraler Vektoren und in Kombination mit zelltypspezifischen Promotoren können diese Opsine selektiv in postmitotischen Neuronen exprimiert werden, von der Einzelzelle zur neuronalen Population. Eine Stimulation mit Licht, welches nicht- oder minimal invasiv über Glasfasern eingestrahlt werden kann, führt je nach Typ des Opsins entweder zu einer Depolarisation oder einer Hyperpolarisation des genetisch modifizierten Neurons und somit zu einer Induktion oder Inhibition neuronaler Aktivität. Somit können genetisch definierte Netzwerkkomponenten mittels Licht bimodal manipuliert werden, wobei die Detektion der neuronalen Antwort auch rein optisch erfolgen kann, mittels einer Ko-Applikation fluoreszierender Indikatoren.

Abstract

Optogenetics: a new method for the causal analysis of neuronal networks *in vivo*

The causal analysis of neuronal network function requires a selective manipulation of genetically defined neuronal subpopulations in the intact living brain. Here, we highlight the method of optogenetics, meeting those needs. We cover methodological aspects, limitations and practical applications in the field of neurosciences. The basis of optogenetics are light-sensitive transmembrane channels and light-driven ion pumps, which can be genetically encoded, without requiring the application of exogenous cofactors. These opsins are expressed in neurons by means of viral gene transfer and cell-specific promoters. Light for stimulation can be non- or minimally invasively delivered by optical fibers. Illumination of opsins results in a depolarization or hyperpolarization of genetically modified neurons, depending on the type of optogenetic actuator. Strong expression levels and sufficient light densities provided, neuronal activity can be optically controlled in the intact network with millisecond precision. By applying fluorescent indicators of neuronal activity, an all-optical neurophysiological approach becomes reality.

Keywords: optogenetics; light stimulation; viral gene transfer; causal manipulation of neuronal networks; circuit-based therapies

Einleitung und Fragestellung

Die Etablierung genetisch kodierter Marker neuronaler Zellpopulationen und die damit einhergehende rasante Entwicklung neuartiger Bildgebungsmodalitäten in den letzten beiden Jahrzehnten offenbarten eine beispiellose Komplexität neuronaler Netzwerke, sowohl auf funktioneller als auch morphologischer Ebene. Diese Komplexität findet ihren Ursprung in der Heterogenität neuronaler Zellpopulationen: so wurden in den letzten Jahren eine Vielzahl neuer

genetisch und funktionell charakterisierter Populationen von Interneuronen beschrieben. Jedoch war bislang eine spezifische Stimulation definierter Netzwerkkomponenten, die dieser Heterogenität gerecht wird, nicht möglich. Elektrische Stimulation von Neuronen führt zu einer globalen unspezifischen Erregung, und pharmakologisch/optische Methoden wie uncaging bedürfen einer kontinuierlichen Applikation eines Substrates und sind daher *in vivo* nur sehr eingeschränkt anwendbar. So hat schon Francis Crick 1979 die Entwicklung einer neuartigen Methodik

zur neuronalen Stimulation eingefordert, die idealerweise mittels Lichtstimulation neuronale Aktivität manipuliert. Nahezu zeitgleich wurden in einzelligen Prokaryonten licht-sensitive Protonenpumpen beschrieben, die sogenannten Bakteriorhodopsine, welche durch den Aufbau eines Protonengradienten eine Umwandlung von Lichtenergie in chemische Energie ermöglichen. Im Laufe der Jahre wurde eine breite Palette lichtsensitiver Membranproteine entdeckt; im Jahre 2003 von der Gruppe um Ernst Bamberg der licht-sensitive Kationenkanal Channelrhodopsin-2 (ChR2) aus der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* (Nagel et al. 2003). ChR2 setzt sich aus einem Opsin mit sieben Transmembranhelizes, welche eine Kanalpore bilden, und dem kovalent gebundenen Chromophor Retinal zusammen. Durch Absorption eines Photons kommt es zu einer trans-cis Isomerisierung des Retinals, welches zur Öffnung der Kanalpore und somit zu einem Kationenfluss in Richtung eines Konzentrationsgefälles führt. Dies steht im Gegensatz zu Rhodopsin, dem Photorezeptor in der Netzhaut von Wirbeltieren, einem G-Protein gekoppelten Rezeptor (GPCR). Bei GPCR wird durch die Konformationsänderung des Proteins die Aktivierung eines G-Proteins ermöglicht und eine Signaltransduktionskaskade induziert. Daher werden Channelrhodopsine als Opsine der Klasse 1, GPCR als Opsine der Klasse 2 bezeichnet. Mittels viralen Gentransfers gelang es der Arbeitsgruppe um Karl Deisseroth im Jahre 2005, ChR2 in postmitotischen Neuronen der Maus zu exprimieren (Boyden et al. 2005). Als entscheidend für den Durchbruch dieser Methodik in den Neurowissenschaften erwies sich der Umstand, dass eine exogene Applikation von Retinal zumindest im Säugerhirn zur Funktionalität von ChR2 nicht nötig ist, da es endogen in ausreichenden Konzentrationen vorhanden ist. Dies steht im Gegensatz zu optochemischen Ansätzen, die eine Applikation von exogenen photosensitiven Liganden erfordern. Dagegen handelt es sich bei ChR2 um einen komplett genetisch enkodierten Aktuator, welcher erstmals in einem Ein-Komponentensystem genetische Expressionsstrategien mit einer optischen Stimulationsmöglichkeit kombiniert und somit den Begriff „Optogenetik“ etabliert. Eine Illumination mit blauem Licht von ChR2 exprimierenden Neuronen führt nun zu einem Influx von Kationen, hauptsächlich Na^{2+} und damit zu einer Depolarisation der neuronalen Zellmembran. Dies führt bei ausreichender Depolarisation zu einem optisch induzierten Aktionspotenzial. Neben ChR2 wurden in den letzten Jahren eine Vielzahl von anderen depolarisierenden Kanalproteinen charakterisiert, die sich in ihren spektralen

Anregungskurven und ihren Kinetiken unterscheiden. Um eine Hemmung neuronaler Aktivität mittels Licht zu erreichen, muss ein aktiver Transport von Ionen erreicht werden. Dazu sind membran-gebundene Ionenpumpen in der Lage, u.a. die lichtgetriebene Protonenpumpe Halorhodopsin aus *Natronomonas pharaonis* (NpHR) (Gradinaru et al. 2010) und die Chloridpumpe Archaerhodopsin-3 (Arch, ArchT) aus *Halobacterium sodomense* (Chow et al. 2010). Hier sollen nun exemplarisch die Arbeitsschritte eines optogenetischen Versuchsansatzes im Säugerhirn sowie ausgewählte Anwendungen im Nager und Primaten dargestellt werden. Unser Hauptaugenmerk liegt dabei weniger auf einer umfassenden Darstellung aller möglichen Expressionsstrategien und optogenetischer Aktuatoren, als vielmehr der Beschreibung grundsätzlicher Möglichkeiten und Limitationen dieser Methodik.

Von korrelativer zur kausalen Analyse neuronaler Netzwerke

Ein kausaler Ansatz erfordert im Gegensatz zu einer korrelativen, deskriptiven Analyse eine direkte, spezifische Manipulation der

Komponenten neuronaler Netzwerke, von der Einzelzelle zur Population. Dabei sollte die Ebene der Spezifität des Manipulationswerkzeuges idealerweise mit der Ebene der deskriptiven Analyse übereinstimmen. Differenzielle Genexpression stellt den Schlüssel zur morphologischen und funktionellen Diversität neuronaler Netzwerke dar und bildet die Basis deskriptiver Analysen, seien es Anwendungen fluoreszierender Antikörper oder transgene Strategien zur differenziellen, promotorabhängigen Expression fluoreszierender Proteine. Optogenetik erreicht diese Spezifität auf der Manipulationsseite durch einen Gentransfer des optogenetischen Aktuators zusammen mit einem zellspezifischen Promotor. Sicherlich bleibt zu berücksichtigen, dass eine massive Expression exogener Membranproteine einen signifikanten Eingriff in die Struktur und Dynamik der neuronalen Zellmembran darstellt. Daher sind bei einem optogenetischen Versuchsansatz umfangreiche Kontrollexperimente zwingend nötig. Durch die Fernwirkung optischer Stimulation ist eine Manipulation neuronaler Aktivität weitgehend ohne Störung des neuronalen Netzes möglich. So wird z.B. eine Stimulation von

Pyramidalzellen der kortikalen Schicht 5 in der Maus mittels einer Glasfaser ohne Verletzung der Pia erreicht, über eine Entfernung von 600 μm . Durch linsenbasierte Glasfasern oder holographische mikroskopische Methoden kann nun eine Stimulation von subzellulären Strukturen unter einem Mikrometer bis zu ganzen kortikalen Netzwerken im Millimeter-Bereich erreicht werden. Es gibt grundsätzlich zwei Methoden Opsine in Neuronen zu exprimieren: den viralen Gentransfer und transgene Ansätze. Beim viralen Gentransfer wird die räumliche Ausdehnung des transduzierten Areal vom Virustiter und dem injizierten Volumen determiniert, wohingegen bei einem transgenen Ansatz typischerweise eine himnweite Expression vorliegt. Dies hat einen signifikanten Einfluss auf die Spezifität der optogenetischen Stimulation. Die am weitesten verbreitete transgene Maus ist die sogenannte Thy1-ChR2-Maus (Linie 18). Im Gegensatz zu einem lokal injizierten Nager wird in einer solchen Maus durch lokale Stimulation ein ganzes Netzwerk aktiviert.

Sicherlich bleibt die elektrophysiologische Einzelzellableitung im Hinblick auf die zeitliche Präzision und direkte Manipu-

Incredible discoveries with Fine Science Tools

FINE SURGICAL
INSTRUMENTS
FOR RESEARCH™

SHIPPING GLOBALLY
SINCE 1974

Request a catalog at
finescience.de or call
+49 (0) 62 21 – 90 50 50

F · S · T®
FINE SCIENCE TOOLS

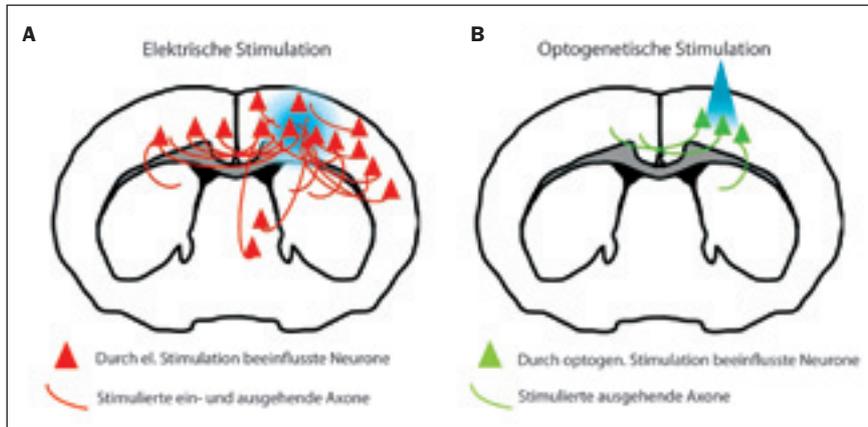


Abb. 1: Elektrische und optogenetische Aktivierungsmuster neuronaler Netzwerke. (A) Kortikale elektrische Stimulation mit typischen Parametern (z.B. 100uA, 300Hz, biphasische 150µs lange Pulse) aktiviert ein weit ausgebreitetes Netzwerk, welches vor allem auf die Stimulation eingehender und passierender Axone zurückzuführen ist. (B) Optogenetische Stimulation eines lokal Opsin-exprimierenden Areals führt zu einer lokal durch die Ausbreitung des Lichts begrenzten Aktivierung von Neuronen. Während Axone prinzipiell ebenfalls optogenetisch stimuliert werden können, werden nicht-exprimierende (da aus nicht injizierten Arealen stammende) Axone nicht aktiviert. Diester

lation des Membranpotenzials bislang unerreicht. Bei einer elektrischen Stimulation ergibt sich jedoch der entscheidende Nachteil der mangelnden Spezifität. Zwar ist es durch geschickte Parameterwahl möglich, den Stimulationseffekt auf bestimmte Elemente der Neurone zu lenken, diese Steuerung beruht jedoch eher auf Wahrscheinlichkeiten als auf Determinismus. So konnte gezeigt werden, dass elektrische Stimulation mit typischen Stimationsparametern hauptsächlich Axone rekrutiert. Mittels Optogenetik ist eine wesentlich spezifischere Manipulation möglich, da die Stimulation sich auf die exprimierenden und illuminierten Neuro-

nenelemente limitiert (Abbildung 1). Ein weiteres unvermeidbares Problem bei der elektrischen Stimulation ist die Generierung eines elektrischen Artefakts. Eine Verbindung von optogenetischer Stimulation und elektrophysiologischer Detektion umgeht jedoch diesen Effekt. Allerdings kann es zu einem photoelektrischen Artefakt kommen, dem sogenannten Bequereffekt. Er entsteht, indem Photonen nur auf einen Teil des ableitenden Metalls der Elektrode treffen. Dadurch kommt es zum Stromfluss zwischen dem beleuchteten und dem nicht beleuchteten Kontakt, was sich wiederum in einer Spannungsänderung niederschlägt

und somit zu einem messbaren Artefakt führt. Dies kann zum Beispiel durch eine geschickte Wahl des Lichteinfallswinkels in Relation zur Elektrode oder aber durch optische Detektion neuronaler Aktivität ("all optical physiology") vermieden werden.

Optogenetische Aktuatoren. Zunächst ist allen Opsinen gemein, dass sie kein endogenes Fluorophor besitzen. Um die Expressionseffizienz und zelluläre Lokalisation bestimmen zu können, wurden die Opsine mit ebenfalls genetisch kodierten Fluorophoren wie GFP, YFP oder mCherry fusioniert. Die Wahl des Fluorophors ist für das optogenetische Stimulationsexperiment nur von eingeschränkter Bedeutung. So liegt die Aktivierungsschwelle von ChR2 bei einer Lichtdichte von 1 mW/mm². Diese wird bei einem reinen Bildgebungsexperiment im Regelfall nicht erreicht, sodass eine Illumination eines ChR2-YFP- Proteins zur Bestimmung der Lokalisation mit 488 nm zu keiner Aktivierung von ChR2 führt.

Genetisch kodierte optogenetische Aktuatoren lassen sich in zwei Klassen unterteilen, in licht-sensitive, depolarisierende Ionenkanäle und lichtgetriebene hyperpolarisierende Ionenpumpen (Tabelle 1). Dabei dient bei den lichtgetriebenen Ionenkanälen Licht lediglich als Vermittler der Konformationsänderung des Chromophors Retinal. Die Kinetik der Öffnung wird durch die Proteinstruktur bestimmt. Dies sollte bei einem Design optogenetischer Stimulationsparameter und bei der Wahl der geeigneten Aktuatoren berücksichtigt werden. So sind Stimulationspulse bereits ab einer Dauer von 1-3 ms effektiv in der Aktivierung der bislang am weitesten verbreiteten Mutante

Tab. 1: Charakteristika ausgewählter erregender und hemmender Opsine. Für Details siehe Mattis et al. 2012

Opsin	Aktivierung (λ)	Kinetik (τ)	Referenz
Depolarisierend, schnelles Schließen des Kanals			
ChR2(H134R)	470 nm	18 ms	Nagel et al. (<i>PNAS</i> , 2003)
ChIEF	450 nm	10 ms	Lin et al. (<i>Biophysical Journal</i> , 2009)
ChETA	470 nm	4 ms	Gunaydin et al. (<i>Nat. Neurosci.</i> , 2010)
VChR1	545 nm	133 ms	Zhang et al. (<i>Nat. Neurosci.</i> , 2008)
C1V1	540 nm	34 - 58 ms	Yizhar et al. (<i>Nature</i> , 2011)
Depolarisierend, step function opsins (SFO)			
ChR2-SFO	470 nm Akt. 590 nm Deakt.	2 s - 29 min	Berndt, et al. (<i>Nat. Neurosci.</i> , 2009)
Hyperpolarisierend, Ionenpumpen			
Arch/ArchT (Chlorid)	566 nm	9 ms	Chow et al. (<i>Nature</i> , 2010)
eNpHR3.0 (Protonen)	590 nm	4 ms	Gradinaru et al. (<i>Cell</i> , 2010)

ChR2(H134R), jedoch schließt dieser Kanal mit einer exponentiellen Zeitkonstante von 18 ms. Nach dieser Zeit sind somit im Mittel noch 37% der Kanäle geöffnet. Dies wirkt sich limitierend auf die maximale effektive Stimulationsfrequenz aus, die bei dieser Mutante bei 40 Hz anzusetzen ist. Jedoch weist dieses Opsin, welches im Vergleich zum Wildtyp eine für den Säuger optimierte Kodonsequenz aufweist, unter allen schnellen Opsinen den nach Ansicht der Autoren besten Kompromiss aus Expressionsstärke, geringer Zytotoxizität und Schnelligkeit auf. Neben diesen schnellen Kanälen wurden durch Punktmutationen Varianten entwickelt, welche Zeitkonstanten im Sekunden- oder Minutenbereich aufweisen, sogenannte step function opsins (SFO). Mittels dieser SFOs kann z.B. die Erregbarkeit eines neuronalen Netzes durch eine unterschwellige dauerhafte Depolarisation moduliert werden.

Hyperpolarisierende, hemmende Ionenpumpen transportieren Ionen bei kontinuierlicher Lichtabsorption auch entgegen ihres Konzentrationsgefälles. Derzeit stellen die

Chloridpumpe Halorhodopsin (eNpHR3.0), sowie die Protonenpumpe Archaeorhodopsin-3 (Arch, ArchT) die verbreitetsten hyperpolarisierende Opsine dar. Es bleibt zu diskutieren, ob eine Verschiebung des Chlorid-Gleichgewichtspotenzials (NpHR) oder der Protonenkonzentration (Arch/ArchT) den signifikanteren Eingriff in die zelluläre Physiologie darstellt.

Methoden der zellspezifischen Expression von Optogenetischen Aktuatoren. Im Zuge der Entwicklung der somatischen Gentherapie wurde eine Vielzahl viraler Vektoren entwickelt, die in der Lage sind, exogene DNA in postmitotische Neurone zu transferieren.

Dabei haben sich Adenoassoziierte Viren (AAVs) der dritten Generation als zuverlässige und sichere virale Vektoren in Nagern und Primaten erwiesen. Es wird fast ausschließlich auf den Serotyp 2 zurückgegriffen, der jedoch mit diversen anderen Serotypen pseudotypisiert wird. Die Nomenklatur für ein AAV des Serotyps 2, pseudotypisiert mit Serotyp 5 ist zum Beispiel AAV2/5, kurz oft als AAV5 abgekürzt. Im Primaten und im

Nager wurden bereits AAV2, AAV2/1 und AAV2/5 getestet. Auch Lentiviren wurden erfolgreich eingesetzt, führen jedoch zu einer niedrigeren Expressions- und Diffusionsrate, wahrscheinlich aufgrund ihres wesentlich größeren Partikeldurchmessers (100nm statt 20nm in AAVs). Auch weisen Lentiviren im Vergleich zu AAVs ein erhöhtes immunogenes Potenzial auf.

Als entscheidend für die Durchführung eines optogenetischen Ansatzes ist eine starke Expression der Opsine zu nennen. Sie müssen in einer hohen Anzahl exprimiert werden, um auch *in vivo* eine effektive Stimulation/Inhibition zu ermöglichen. Dies ist zum einen abhängig vom Tropismus und Titer des Virus, jedoch stellt auch die Stärke des Promotors eine entscheidende Limitation dar. So sind eine Vielzahl von zelltypspezifischen Promotoren, im besonderen für Interneurone (GAD67, 5HT3), durchaus geeignet, eine spezifische Expression von fluoreszierenden Fluorophoren für deskriptive Analysen zu erreichen, dies reicht jedoch bei Weitem nicht für eine funktionelle optogenetische Stimulation aus.



Thomas RECORDING GmbH

High Tech Made in GERMANY - info@ThomasRECORDING.com

Electrodes



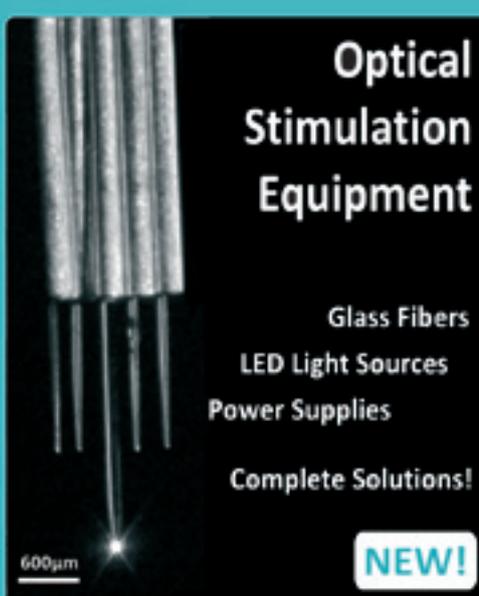
Tetrodes

Heptodes

100µm

Microdrive Systems

Optical Stimulation Equipment



Glass Fibers
LED Light Sources
Power Supplies

Complete Solutions!

NEW!

Bidirectional Rat Telemetry

NEW!



Wireless RECORDING & STIMULATION

For more than 20 years complete Neuro-Laboratory Equipment available from:

www.ThomasRECORDING.com



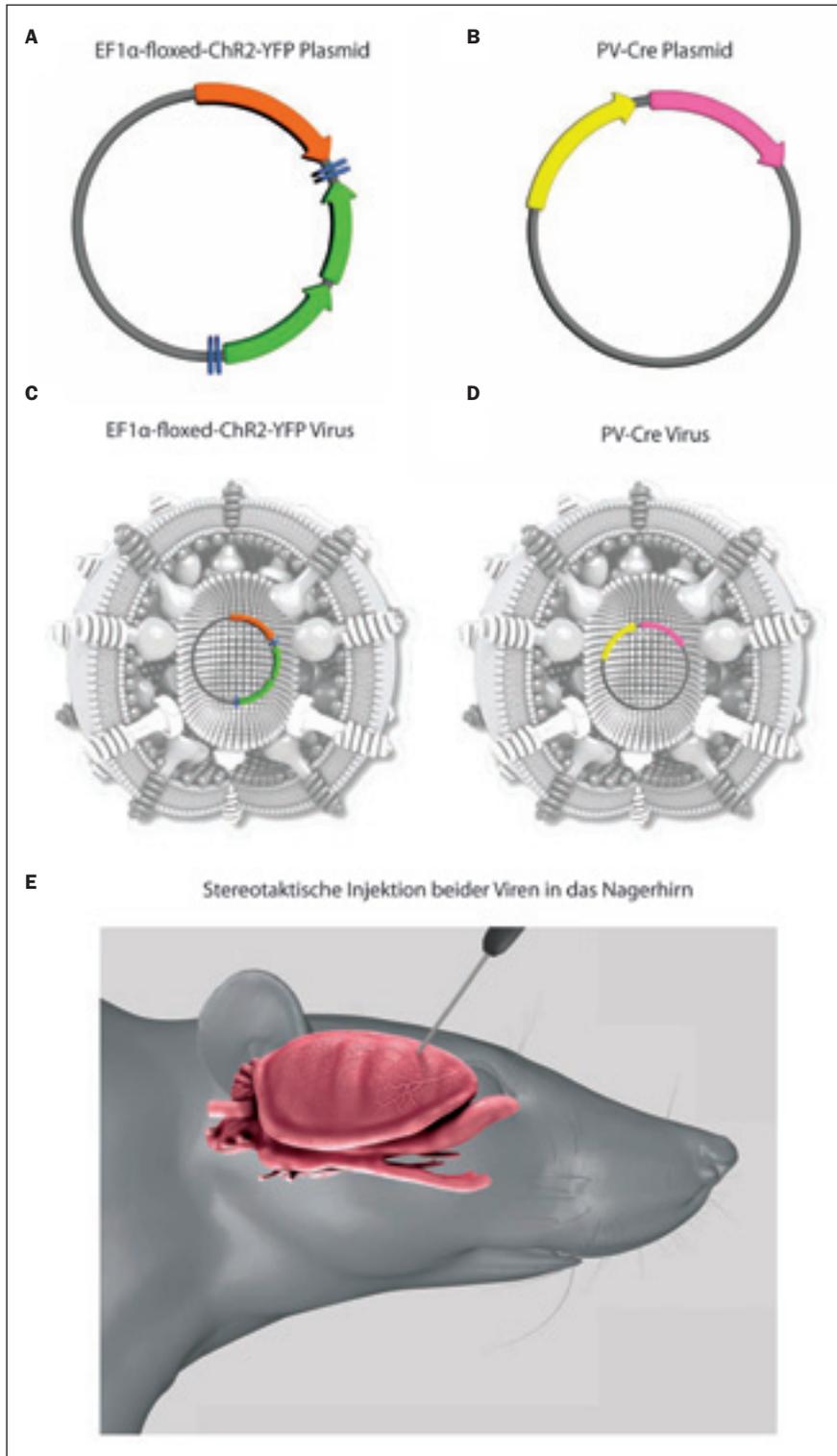



Abb. 2: Arbeitsschritte eines optogenetischen Ansatzes (1). A) Klonierung eines viralen Plasmids mit den Sequenzen des doppelt-gefloxten invertierten Opsins und des Fluorophors (ChR2-YFP)(grün), sowie des ubiquitären Promotors (EF1α)(orange). B) Sequenz der Cre-Rekombinase (rosa) und des zelltypspezifischen Promotors Parvalbumin (PV)(gelb) in einem zweiten viralen Plasmid. C, D) In Helferzellen und mittels weiterer viraler Plasmide werden zwei Viren *in vitro* produziert. E) Stereotaktische Injektion beider Viren (typischerweise im Verhältnis 1 (Cre) : 4 (ChR2-YFP) in das Nagerhirn, in einem Volumen von 0,1-0,5 μ l. Tobias Jung, Universität Jena

Eine Limitation für den Einsatz von AAVs in der Optogenetik stellt die eingeschränkte Kapazität des Vektors von maximal 4,7 kb dar. Dies ist für viele zelltypspezifische Promotoren nicht ausreichend. Jedoch können folgende Promotoren direkt vor das Opsin-Gen kloniert werden und führen zu einer spezifischen und effektiven Expression: CamKIIa (exzitatorische Neurone), hSyn (alle Neurone), hThy-1 und mThy-1 (humane und murine Version des Promotors, alle Neurone, niedrigere Expressionsrate als hSyn), Efla (alle Zellen einschließlich Mikrogliazellen), CAG (alle Zellen einschließlich Mikrogliazellen, extrem hohe Expressionraten), SST (Somatostatin-positive Neurone), Hypocretin (Hypocretin-positive Neurone).

Um die mangelnde Promotorstärke sowie die beschränkte Kapazität des AAV zu umgehen, bietet sich die Anwendung des Cre/loxP-Systems an (Abbildungen 2, 3). In einem viralen Plasmid wird dazu das Opsin/Fluorophor-Fusionsprotein und ein starker ubiquitärer Promotor (EF1 α) invertiert (3'-5' statt 5'-3') und durch zwei loxP-Sequenzen doppelt gefloxt. In einem zweiten viralen Plasmid wird das Enzym Cre-Rekombinase unter Kontrolle eines zelltypspezifischen Promotors (z.B. GAD67, PV) gestellt. Werden nun beide virale Vektoren koinjiziert, kommt es nur in den Zielzellen zur Rekombination, dafür ist die Stärke des zelltypspezifischen Promotors ausreichend. Nach der Rekombination erfolgt nun die Expression des Opsins unter Kontrolle des starken ubiquitären Promotors (EF1 α) und die geringe Expression des zelltypspezifischen Promotors wird umgangen. Neben einer Koinjektion von zwei viralen Vektoren ist auch eine Injektion des gefloxten Optogenetikvektors in die Vielzahl existierender transgenen Cre-Mauslinien eine sehr gute und viel genutzte Option.

Methoden der optischen Stimulation. Der nächste Schritt eines optogenetischen Versuchsansatzes besteht in der Wahl der geeigneten Illumination. Abhängig vom Opsin müssen lokale Lichtdichten von mindestens 1-10 mW/mm² erreicht werden. Höhere Lichtdichten führen zu einer Erhöhung der Photoströme, jedoch sind ab ca. 50 mW/mm² in der Regel bereits alle Opsine im illuminierten Areal aktiviert. Diese Lichtdichten werden durch die Einkopplung von 50-100 mW Lasern sowohl bei einer direkten Einkopplung in eine Glasfaser als auch in ein Mikroskopiesystem im Regelfall erreicht. Bei einer Einkopplung von Lasern in eine Glasfaser kann die Größe des beleuchteten Areals nahezu frei bis zu

Dimensionen von 500 μm definiert werden. So sind durch linsenbasierte Glasfasern auch Illuminationsbereiche von wenigen Mikrometern möglich. Optische Fasern können entweder akut eingesetzt werden oder chronisch (zum Beispiel implantierbare kurze Glasfaserenden, die über ein Verbindungsstück mit einer langen Glasfaser verbunden werden). Während akut eingeführte Fasern auch pharmakologische Manipulationen an derselben Stelle zulassen, haben sie den entscheidenden Nachteil, dass sie sehr leicht brechen. Chronisch implantierte Fasern dagegen erlauben keine weitere pharmakologische Manipulation (es sei denn man implantiert eine weitere Kanüle direkt neben der Faser) sind jedoch wesentlich robuster und halten über Wochen bis Monate. Laserdioden sind weit verbreiteter als Lichtquellen und sind einfach in optische Fasern zu koppeln. Des Weiteren können Licht-emittierende Dioden (LEDs) auch direkt auf dem Hirngewebe angewendet werden. Dabei ist jedoch zu beachten, dass die entstehende Wärme abgeleitet werden muss, um das Gewebe nicht zu zer-

stören. LEDs können jedoch auch direkt in eine Faser eingekoppelt werden, allerdings mit signifikantem Verlust an Lichtleistung.

Für zukünftige Anwendungen ist es erstrebenswert, kleine, komplett implantierbare LEDs zu verwenden. Es gibt bereits einige Prototypen aber es kam noch nicht zu einer Anwendung *in vivo*.

Anwendungen in den Neurowissenschaften

Durch die dargelegte Zellspezifität des optogenetischen Ansatzes hat sich in den letzten Jahren unser Verständnis von der Komplexität neuronaler Netzwerkfunktion entscheidend erweitert. So konnten unter anderem die Störungen der funktionellen Netzwerkhomeostase bei Autismus und Schizophrenie kausal analysiert (Yizhar et al. 2011), der Mechanismus der neurovaskulären Kopplung in der fMRT nachgewiesen (Lee et al. 2010), und die neuronale Differenzierung von Stammzellen besser verstanden werden (Stroh et al. 2011). Aus dieser Vielzahl an Studien zeigen wir hier drei Beispiele:

Verbindung von optogenetischer Stimulation mit optischen Methoden der Detektion neuronaler Aktivität

Neben dem hier vorgestellten optogenetischen Ansatz der funktionellen Manipulation wurden in den letzten Jahren Methoden entwickelt, neuronale Aktivität optisch zu detektieren. Dabei werden fluoreszierende Indikatoren verwendet, die auf Änderung der Konzentration von intrazellulärem Kalzium mit einer Änderung ihrer Fluoreszenzemission reagieren. Bei einem neuronalen Aktionspotenzial kommt es zu einem definierten Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration, hauptsächlich vermittelt durch das Öffnen spannungsabhängiger Kalziumkanäle in der neuronalen Zellmembran. Somit kann eine Erhöhung der Fluoreszenzemission des Kalziumindikators als optisches Korrelat neuronaler Aktivität interpretiert werden. Es wurde ChR2 mittels viralen Gentransfers im visuellen Kortex exprimiert. Zwei Wochen nach Virusinjektion wurde ebenfalls im visuellen Kortex der fluoreszierende Kalziumindikator Oregon-Green injiziert. Über eine Glasfaser mit einem Durchmesser von 200 μm

Motorized Stereotaxic

The 3rd generation of stereotaxic instruments



- Atlas Integration
- High Accuracy
- High Reproducibility
- High Throughput

Smart Add-Ons

- **Drill** Robot
- **Microinjection** Robot
- **Microdialysis** Robot



www.neurostar.de
 info@neurostar.de
 +49 7031 415065

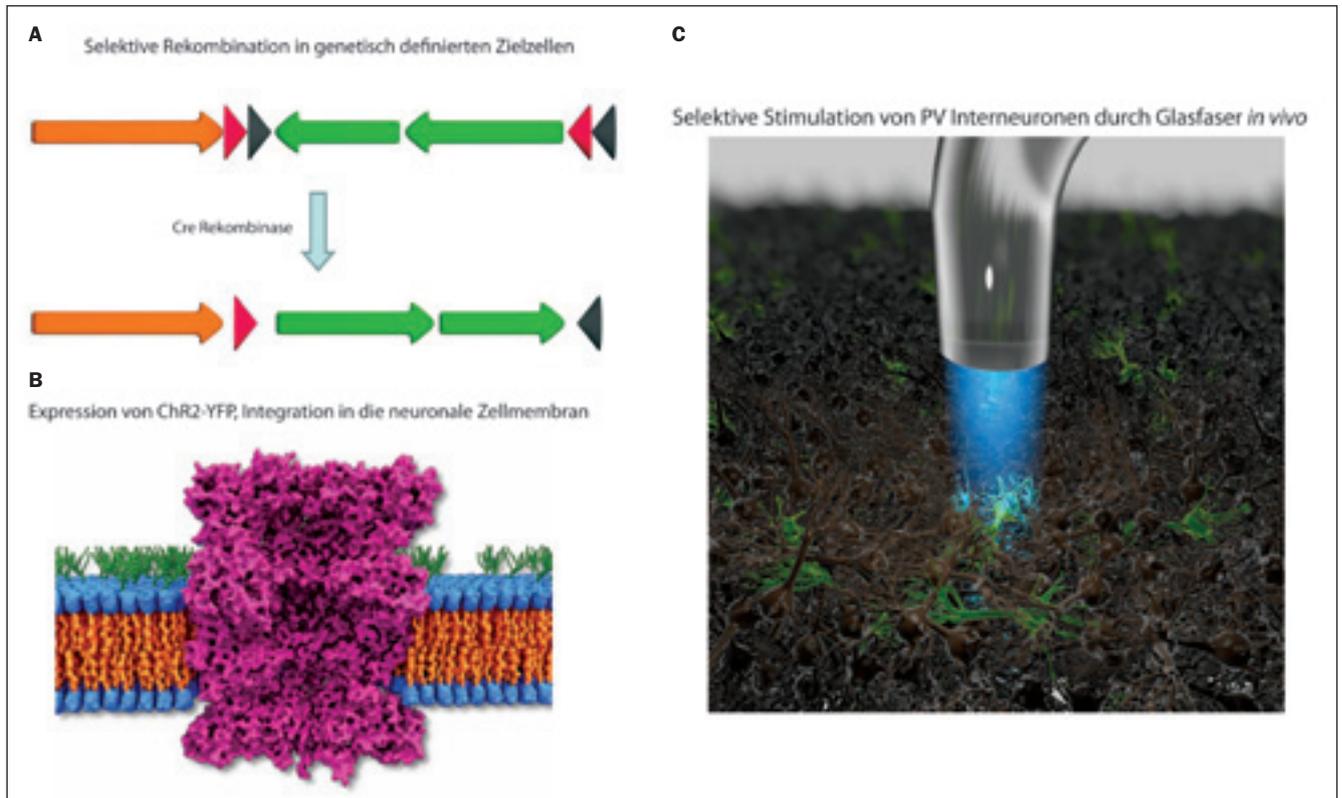


Abb. 3: Arbeitsschritte eines optogenetischen Ansatzes (2). A) Im Laufe von 5-10 Tagen nach der Injektion kommt es nur in den PV exprimierenden, mit beiden Viren infizierten Interneuronen zu einer Expression der Cre-Rekombinase und zu einer Rekombination der ChR2-YFP-Sequenz. B) Unter Kontrolle des starken EF1 α -Promotors wird die ChR2-YFP-Sequenz transkribiert und translatiert. Das ChR2-YFP-Fusionsprotein wird in die neuronale Zellmembran integriert. C) Nach Implantation einer Glasfaser werden bei Illumination mit blauem Licht selektiv nur PV-Interneurone *in vivo* stimuliert. Tobias Jung, Universität Jena

wurde nun mittels blauen Lichts sowohl dieser Indikator als auch ChR2 angeregt. Wie oben dargelegt, benötigt die Aktivierung von ChR2 eine minimale effektive Lichtdichte von 1 mW/mm². Für die Anregung von Oregon Green sind jedoch bereits Lichtdichten von 0.01 mW/mm² effektiv, weit unterhalb dieses Schwellenwertes. Die Intensität des Emissionslichts wird über die Glasfaser mittels einer Photodiode mit hoher zeitlicher Auflösung detektiert. Somit ist die Summe der neuronalen Aktivität der neuronalen Population im illuminierten und gefärbten Areal messbar (Grienberger et al. 2011). Im visuellen Kortex der anästhesierten Maus konnten zunächst spontane langsame Kalziumwellen detektiert werden. Diese neuronale Populationsaktivität steht im Zusammenhang mit langsamen Oszillationen im Frequenzbereich von <1Hz, welche eine wichtige Rolle bei der Gedächtnisbildung und der Steuerung schneller Oszillationen spielen. Der Ort der Entstehung dieser Wellen wurde jedoch noch nicht kausal nachgewiesen. Mittels Lichtpulsen hoher Intensität wurden genetisch definierte Pyramidalzellen der kortikalen Schicht 5 optogenetisch angeregt. Es zeigte sich, dass

eine lokale kortikale neuronale Population in der Lage ist, eine globale Kalziumwelle auszulösen, die sich von spontanen Wellen nicht unterscheidet (Abbildung 4).

Optogenetik im wachen Tier; Verhalten. Verhaltensexperimente mit optogenetischen Manipulationen bieten entscheidende Vorteile beim zeitlichen Ablauf. Zum Beispiel erlaubt die sofortige Umkehrbarkeit des Effekts des Lichtes verglichen mit der langen Auswaschzeit von pharmakologischen Reagenzien eine Verkürzung der Verhaltenstest auf oft nur einen Tag verglichen mit den ansonsten üblichen Tests über mehrere Tage. Ein Verhaltenstest auf dem elevated Plus-Maze mit Optogenetik erlaubt zum Beispiel einen *within-subject* Vergleich zwischen Konditionen (Licht an und Licht aus) in einer einzigen Sitzung (Tye et al. 2011).

Neben diesen Vorteilen ontogenetischer Stimulation gibt es jedoch auch einige wichtige Faktoren, die beim Einsatz dieses neuen Werkzeuges beachtet werden müssen. Eine wichtige Limitation ist die Hitzeentwicklung durch die Lichteinwirkung. Hohe Lichtintensitäten bei konstanter oder nahezu

konstanter Belichtung kann zu hitzebedingten Zellveränderungen führen. Die Hitze kann zum einen die Zellaktivität verändern, zum anderen aber auch Zellschäden verursachen. Deshalb sollten in jeder Versuchsgruppe auch Kontrolltiere eingeschlossen werden. Am besten geeignet sind dazu YFP-Kontrollen, d.h. Tiere, die exakt gleich behandelt werden wie die Testtiere, nur dass das bei ihnen injizierte Virus nur das Fluorophor-Gen, nicht jedoch das Opsin-Gen beinhaltet. Eine weitere Einschränkung der Optogenetik ist die potenzielle Toxizität bei sehr hohen Expressionsniveaus von Opsin und Fluoreszenzprotein oder nach langzeitiger Expression. Ein Überschreiten eines bestimmten Expressionsniveaus könnte zur Verdrängung anderer wichtiger endogener Kanäle in der Zellmembran führen. Um dies zu überprüfen, können zum Beispiel unter identischen Bedingungen (d.h., gleiches Opsin, Zelltyp, viraler Vektor, Virusmenge, Virustiter, Expressionsdauer, Lichtintensität) intrazelluläre Ableitungen im Hirnschnitt durchgeführt werden.

Optogenetik in Primaten. Nicht-humane Primaten stellen nach wie vor das primäre



npi

Electronic Instruments
for the Life Sciences

made to measure

NEW Low-Price Instrument Series



AUD-08 B
Audio monitor for
up to four EXT-02 B
amplifiers



RES-08 B
Resistance test for
up to four EXT-02 B
amplifiers



EXT-08 B
Extracellular
amplifier with filters
and gain

In Vivo Recordings with Miniature Headstages



Available for EXT, ELC, SEC, BA and VA Amplifiers

Sensapex piezo driven
micromanipulator for
use with npi miniature
headstages, with **long
range** (20 mm) of
piezo movement,
high acceleration
and a **virtual fourth axis**



**npi provides complete
rigs for electrophysiology**
npi is distributing:

- **ALA Scientific** perfusion systems and accessories
- **Burleigh** micropositioners and mounts
- **Campden** vibrating microtomes
- **Lumen Dynamics** X-Cite fluorescence illumination
- **Molecular Devices** amplifiers and data acquisition
- **NeuroNexus** acute and chronic electrodes
- **Scientifica** micropositioners, mounts, SliceScope
- **Sensapex** piezo driven micromanipulator

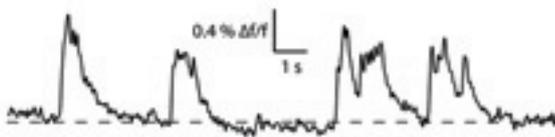
npi electronic GmbH

Phone +49 (0)7141-97302-30; Fax: +49 (0)7141-97302-40
support@npielectronic.com; <http://www.npielectronic.com>

A Expression von ChR2-mcherry im visuellen Kortex der Maus



B Spontane Kalziumwellen im visuellen Kortex *in vivo*



C Optogenetisch induzierte Kalziumwellen

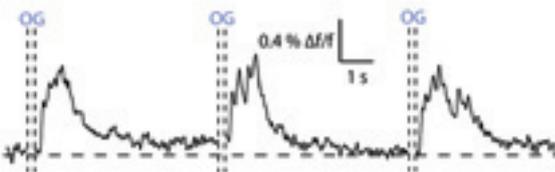


Abb. 4: Induktion von Kalziumwellen durch optogenetische Stimulation der kortikalen Schicht 5 in der Maus *in vivo*. A) Sagittaler Schnitt, Bildgebung mittels eines konfokalen Fluoreszenzmikroskopes. Stereotaktische Injektion von ChR2-mCherry AAVs in den visuellen Kortex der Maus führt zu einer starken Expression in Schicht 5. Neben der Zellmembran der Somata stellen sich anterograde axonale Projektionen in die visuellen thalamischen Kerne sowie apikale Dendriten dar. B) Nach lokaler Färbung des visuellen Kortex *in vivo* mit dem Kalziumindikator Oregon Green wird eine optische Faser implantiert. Bei Illumination des Indikators mit geringer Lichtintensität und Detektion der Fluoreszenzemission über die Faser können in der anästhesierten Maus spontane, langsame Kalziumwellen beobachtet werden. C) Stimulation der ChR2-exprimierenden Pyramidalzellen der Schicht 5 mittels Lichtpulsen hoher Intensität induzieren langsame Kalziumwellen. Die optogenetisch induzierten Wellen lassen sich nicht von spontan auftretenden Wellen unterscheiden. Dies zeigt in einem kausalen Ansatz, dass definierte lokale kortikale Population in der Lage sind, globale Kalziumwellen zu generieren. Stroh, Adelsberger, Ruehlmann, Konnerth.

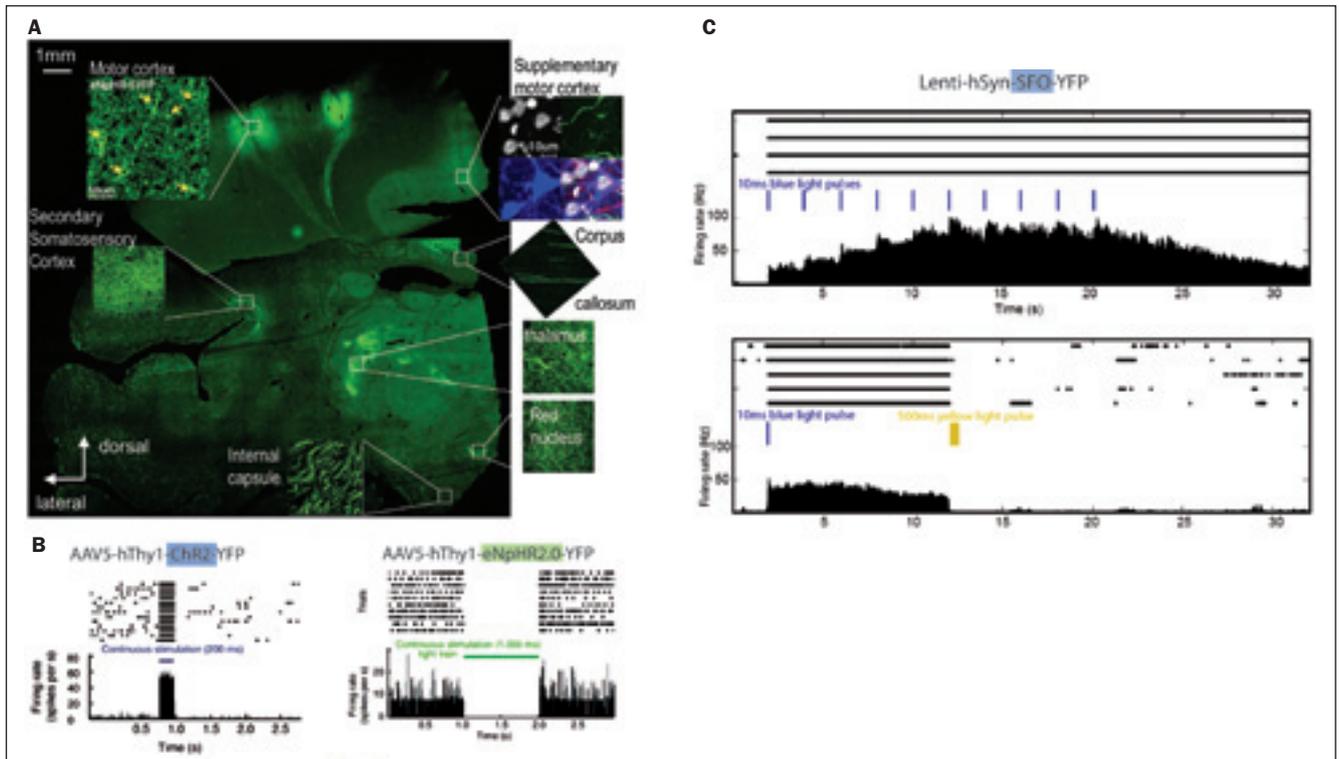


Abb. 5: Histologische und elektrophysiologische Ergebnisse im optogenetisch modifizierten Rhesusaffen. A) Histologische Untersuchung. Es wurde im Motorkortex eines Rhesusaffen zweifach injiziert, was zu zwei lokalen Expressionsstellen führte. Einzelne, durch das Fusionsprotein EYFP angefärbte Neurone sind in der Vergrößerung erkennbar. Ausgehende Axone sind ebenfalls durch das Fluoreszenzprotein EYFP angefärbt. Neben den direkt vom Motorkortex ausgehenden Fasern sind auch angefärbte Axone im Supplementary Motor Areal (SMA), im somatosensorischen Kortex (S2), im Roten Nucleus, im Thalamus, im Corpus Callosum, das Verbindungsaxone zur anderen Hemisphäre enthält, und in der Internen Kapsel, die zum Rückenmark führende Fasern enthält. **B-D) Elektrophysiologische Dokumentation von licht-evozierten bzw. -unterdrückten Potenzialen.** B) Ein blauer Lichtpuls erzeugt Aktionspotenziale in einem ChR2-exprimierenden Areal. Die Kontrolle ist millisekundengenau. Hier gezeigt ist ein 200 ms-Lichtpuls. Typischerweise werden kürzere Pulse von 1-2 ms verwendet. **C)** Grünes Licht unterdrückt jegliche Aktionspotenziale in einer NpHR2.0 exprimierenden Zelle. **D)** Das sogenannte Step Function Opsin (SFO) wird durch einen einzigen kurzen blauen Lichtpuls (10 ms) angeregt. Pulst man diesen wiederholt, akkumuliert sich der Effekt, bis ein Plateau neuronaler Aktivität erreicht ist. Der Effekt eines einzelnen Lichtpulses kann mehrere Sekunden anhalten, bei neueren Versionen sogar bis zu 30 min. Dieser Effekt kann durch einen gelben Lichtpuls gestoppt werden. Diester et al.

Modell für feine Motorkontrolle und hochkognitive Fähigkeiten dar. Daher ist eine Anpassung optogenetischer Techniken an dieses Modell extrem erstrebenswert. Erste Etablierungsversuche in Rhesusaffen konnten klar zeigen, dass die Prinzipien optogenetischer Manipulation von Neuronen auch im Primaten funktionieren und dass identische virale Vektoren, Opsine und Promotoren funktionell sind (Diester et al. 2011).

Injektionen von AAVs im Motor- und prämotorischen Kortex führten zuverlässig zu starker Opsinexpression in bis zu 80% der Neuronen. Besonders der Promoter hSyn erwies sich als sehr effektiv. Anschließend optische Stimulation mit blauem Licht erlaubte ein Millisekunden-präzises Anschalten der ChR2-exprimierenden Neurone. Im Gegensatz konnten Halorhodopsin-exprimierende Neurone komplett mit gelbem Licht ausgeschaltet werden, d.h. spontan auftretende

Aktionspotenziale wurden unterdrückt. Das Step Function Opsin (SFO) – ein besonders lichtsensitives Opsin mit langsamen Kinetiken, führte zu stark gesteigerten Antwortfrequenzen. Dieser Anstieg der Aktionspotenzialgenerierung konnte sofort durch einen gelben Lichtpuls rückgängig gemacht werden, der das Opsin wieder in den Dunkelzustand versetzt.

Während die Modulation neuronaler Aktivität problemlos funktionierte, stellte die Beeinflussung von Verhalten im Primaten zunächst eine Herausforderung dar. So konnte im Motorkortex an Stellen, an denen leicht durch elektrische Stimulationen Bewegungen der Hand hervorgerufen werden konnten, keine optogenetisch evozierten Bewegungen gemessen werden. Ob dies ausschließlich dem größeren Hirnvolumen oder aber komplexeren neuronalen Schaltkreisen sowie kognitiven Strategien zuzuschreiben ist, bleibt zu untersuchen. Mittlerweile konnten jedoch

auch verschiedene Verhalten durch optogenetische Stimulation beeinflusst werden. So werden Reaktionszeiten durch Stimulation im prämotorischen Kortex signifikant verlängert und die Richtung von Augenbewegung durch Stimulation im frontalen Augenfeld (FEF) oder im primären visuellen Kortex beeinflusst. Gemein ist allen Ansätzen, dass es eher um eine Beeinflussung, nicht jedoch um ein direktes Hervorrufen eines motorischen Verhaltens geht.

Präklinische Anwendungen. Wir stellen beispielhaft zwei Anwendungen optogenetischer Strategien vor, die eine Aussicht auf eine mittelfristige klinische Translation haben, Retinitis pigmentosa und Anwendungen im peripheren Nervensystem.

Retinitis pigmentosa fasst eine diverse Gruppe erblicher Krankheiten zusammen, die zu unheilbarer Blindheit führen. Alle Typen

dieser degenerativen Erkrankung haben das frühe Absterben der hoch sensitiven Stäbchen gemein, während die wenig sensitiven Zäpfchen länger erhalten bleiben. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression des Opsins NpHR in den Zäpfchen die natürliche Phototransduktionskaskade und damit in gewissem Maße die Lichtsensitivität in einem Mausmodell für retinitis pigmentosa wiederherstellen kann. Hinzu konnte in *ex vivo* Retinas menschlichen Ursprungs die Reaktivierung der Lichtsensitivität von Fotorezeptoren gezeigt werden. Diese Therapie könnte einer großen Gruppe von Patienten helfen (Busskamp et al. 2010).

Eine weitere mögliche klinische Anwendung basiert auf Stimulationen des peripheren Nervensystems. Bisher konzentrierte man sich auf elektrische Stimulationen. Diese rekrutieren jedoch bevorzugt die großen, schnell ermüdenden Motoreinheiten und erst später die kleineren Motoreinheiten, wenn schwache elektrische Stimulation angewendet wird. Da dies genau die umgekehrte Reihenfolge der natürlichen Rekrutierung darstellt, stellt dies einen limitierenden Faktor für therapeutische Anwendungen dar. Es konnte gezeigt werden, dass optogenetische Stimulation von peripheren Nervenfasern dieses Hindernis überwinden kann. Dies führt zu einer gesteigerten Leistungsfähigkeit eines solchen Stimulationsapparats.

Noch ist unklar, ob optogenetische Manipulationen auch klinische Anwendungen finden werden, jedoch gibt es bereits einige Hinweise darauf. So sind die Ergebnisse der optogenetischen Behandlung von Retinadegeneration sehr vielversprechend. Eine Weiterentwicklung der Strategien des somatischen Gentransfers sollte die Basis für Anwendungen optogenetischer Strategien im Menschen bilden.

Literatur

- Boyden, E.S., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G. und Deisseroth, K. (2005): Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat. Neurosci.* 8, 1263-1268.
- Busskamp, V., Duebel, J., Balya, D., Fradot, M., Viney, T.J., Siebert, S., Groner, A.C., Cabuy, E., Forster, V., Seeliger, M., Biel, M., Humphries, P., Paques, M., Mohand-Said, S., Trono, D., Deisseroth, K., Sahel, J.A., Picaud, S. und Roska, B. (2010): Genetic reactivation of cone photoreceptors restores visual responses in retinitis pigmentosa. *Science* 329, 413-417.
- Chow, B.Y., Han, X., Dobry, A.S., Qian, X., Chuong, A.S., Li, M., Henninger, M.A., Belfort, G.M., Lin, Y., Monahan, P.E. und Boyden, E.S. (2010): High-performance genetically targetable optical neural silencing by light-driven proton pumps. *Nature* 463, 98-102.
- Diester, I., Kaufman, M.T., Mogri, M., Pashaie, R., Goo, W., Yizhar, O., Ramakrishnan, C., Deisseroth, K. und Shenoy, K.V. (2011): An optogenetic toolbox designed for primates. *Nat. Neurosci.* 14, 387-397.
- Gradinaru, V., Zhang, F., Ramakrishnan, C., Mattis, J., Prakash, R., Diester, I., Goshen, I., Thompson, K.R. und Deisseroth, K. (2010): Molecular and cellular approaches for diversifying and extending optogenetics. *Cell* 141, 154-165.
- Grienberger, C., Adelsberger, H., Stroh, A., Milos, R.I., Garaschuk, O., Schierloh, A., Nelken, I. und Konnerth, A. (2011): Sound-evoked network calcium transients in mouse auditory cortex in vivo. *J. Physiol.*
- Lee, J.H., Durand, R., Gradinaru, V., Zhang, F., Goshen, I., Kim, D.S., Fenno, L.E., Ramakrishnan, C. und Deisseroth, K. (2010): Global and local fMRI signals driven by neurons defined optogenetically by type and wiring. *Nature*.
- Mattis, J., Tye, K.M., Ferenczi, E.A., Ramakrishnan, C., O'Shea, D.J., Prakash, R., Gunaydin, L.A., Hyun, M., Fenno, L.E., Gradinaru, V., Yizhar, O. und Deisseroth, K. (2012): Principles for applying optogenetic tools derived from direct comparative analysis of microbial opsins. *Nat. Methods* 9, 159-172.
- Nagel, G., Szellas, T., Huhn, W., Kateriya, S., Adeishvili, N., Berthold, P., Ollig, D., Hegemann, P. und Bamberg, E. (2003): Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 13940-13945.
- Stroh, A., Tsai, H.C., Wang, L.P., Zhang, F., Kressel, J., Aravanis, A., Santhanam, N., Deisseroth, K., Konnerth, A. und Schneider, M.B. (2011): Tracking stem cell differentiation in the setting of automated optogenetic stimulation. *Stem Cells* 29, 78-88.
- Tye, K.M., Prakash, R., Kim, S.Y., Fenno, L.E., Grosenick, L., Zarabi, H., Thompson, K.R., Gradinaru, V., Ramakrishnan, C. und Deisseroth, K. (2011): Amygdala circuitry mediating reversible and bidirectional control of anxiety. *Nature* 471, 358-362.
- Yizhar, O., Fenno, L.E., Prigge, M., Schneider, F., Davidson, T.J., O'Shea, D.J., Sohal, V.S., Goshen, I., Finkelstein, J., Paz, J.T., Stehfest, K., Fudim, R., Ramakrishnan, C., Huguenard, J.R., Hegemann, P. und Deisseroth, K. (2011): Neocortical excitation/inhibition balance in information processing and social dysfunction. *Nature* 477, 171-178.

Kurzbiografien

Albrecht Stroh: 1994-1996 Studium der Biologie an der Freien Universität Berlin. 1996-2001 Studium der Biophysik an der Humboldt-Universität zu Berlin. 2002-2005 Doktorarbeit an der Charité Berlin, Neuroradiologie/Neurologie; Thema: Bildgebung von magnetisch markierten Stammzellen in experimentellen Krankheitsmodellen des ZNS mittels zellulärer Magnetresonanztomografie. 2006-2007 Postdoktorand an der Stanford University bei Karl Deisseroth; Thema: Etablierung der Optogenetik in der kausalen Analyse der neuronalen Differenzierung von Stammzellen. 2007-2012 Postdoktorand an der technischen Universität München bei Arthur



Take a closer look and discover a single source for your surgical tools

download your free copy of the current catalogue at www.wpi-europe.com

World Precision Instruments Germany GmbH
Zossener Str. 55
10961 Berlin, Germany

Tel +49 (0)30 6188845
Fax +49 (0)30 6188670
E-Mail wptide@wpi-europe.com



Konnerth; Thema: Verbindung von Optogenetik und Ca^{2+} -Bildgebung zur Untersuchung cortico-thalamischer Oszillationen. Seit 2012 W1-Professor für Optogenetik und Molekulares Imaging am Forschungsschwerpunkt Translationale Neurowissenschaften (FTN) und Institut für mikroskopische Anatomie und Neurobiologie, Universität Mainz; Thema: Anwendungen der Optogenetik in Verbindung mit 2-Photonenmikroskopie zur Untersuchung von neuronalen Netzwerken *in vivo*.

Ilka Diester: 1998-2003 Studium der Biologie an der Humboldt-Universität zu Berlin. 2003-2008 Doktorarbeit am Hertie-Institut für klinische Hirnforschung, Tübingen; Thema: Neuronale Grundlagen numerischer Kompetenz in nicht-humanen Primaten. 2008-2011 Postdoktorandin an der Stanford University bei Karl Deisseroth und Krishna Shenoy; Thema: Etablierung der Optogenetik im nicht-humanen Primaten. Seit 2011 Gruppenleiterin am Ernst-Strüngmann-Institut für Neurowissenschaften in Kooperation mit der Max-Planck-Gesellschaft; Thema: Optogenetik in sensorisch-motorischen Kreisläufen.

Korrespondenzadressen

Albrecht Stroh

Institut für Mikroskopische Anatomie und Neurobiologie, Forschungsschwerpunkt translationale Neurowissenschaften (ftn)
Johannes-Gutenberg-Universität Mainz
Rhine-Main Neuroscience Network (rmn2)
Hanns-Dieter-Hüsch-Weg 19
55128 Mainz
Tel.: +49 6131 3921347
Fax: +49 6131 3921386
E-Mail: albrecht.stroh@unimedizin-mainz.de
www.unimedizin-mainz.de/rgmio/home.html

Ilka Diester

Ernst-Strüngmann-Institut (ESI) für Neurowissenschaften in Kooperation mit der Max-Planck-Gesellschaft
Rhine-Main Neuroscience Network (rmn2)
Deutschordenstr. 46
60528 Frankfurt a.M.
Tel.: +49 69 96769 571
E-Mail: ilka.diester@esi-frankfurt.de
www.esi-frankfurt.de/research/diester-lab/

Die Autoren danken Tobias Jung, Universität Jena, für die Anfertigung der Abbildungen 2 & 3 und Olga Arne, Joint Masterstudentin in Neuroscience Basel-Strasbourg-Freiburg/Ernst-Strüngmann-Institut für Ihre Hilfe bei der englischen Übersetzung für die Online-Version des Artikels.

© Springer-Verlag GmbH 2012

Das endogene Cannabinoidsystem

Eva Drews und Andreas Zimmer

Zusammenfassung

Cannabis sativa, die Hanfpflanze, wird seit vielen tausend Jahren kultiviert und als Heilpflanze und Rauschmittel genutzt. Die wissenschaftliche Erforschung der psychoaktiven Inhaltsstoffe von *Cannabis sativa* und ihrer Wirkungen im Gehirn hat vor ca. 50 Jahren begonnen und zur Entdeckung des endogenen Cannabinoidsystems geführt. Wir wissen heute, dass dieses System bei der Kommunikation zwischen Nervenzellen einen wichtigen Rückkopplungsmechanismus darstellt. Das System ist aber nicht nur im Gehirn aktiv. Besonders bei Erkrankungen findet man eine Aktivierung des endogenen Cannabinoidsystems in vielen Geweben und Organen. Das Interesse an diesem System als möglicher Angriffspunkt für neue Medikamente ist deshalb sehr groß. Die zurzeit im Handel befindlichen Medikamente basieren alle noch auf Cannabisextrakten oder sind synthetische Präparationen der Wirkstoffe. Diese Medikamente werden vor allem zur Therapie chronischer Schmerzen angewendet. In diesem Übersichtsartikel werden wir die Funktionen des endogenen Cannabinoidsystems bei der Schmerzwahrnehmung näher beleuchten und ein neues pflanzliches Cannabinoid vorstellen, das Bestandteil unserer täglichen Nahrung ist.

The endogenous cannabinoid system

The hemp plant *Cannabis sativa* has been cultivated since thousands of years and is used as a medical plant and intoxicant. Scientific research on the psychoactive substances of *Cannabis sativa* and their effects on the brain has started around 50 years ago and led to the discovery of the endogenous cannabinoid system. Today we know that this system represent an important feedback mechanism that modulates the communication between neurons. However, this system is not only active in the brain, but is known to be activated in different tissues and organs during specific disease states. Consequently, there is an increasing interest in this system as a possible target for the development of new drugs. The currently commercially available drugs are based on cannabis extracts or synthetic compounds of the plant's active components and are mainly used to treat chronic pain. In this review we will elucidate the mechanisms of the endogenous cannabinoid system in pain perception and present a new herbal (phyto)cannabinoid which is a constituent of our daily food.

Keyword: endocannabinoids; chronic pain; inflammation; β -caryophyllene

Cannabispräparate: Droge und Medizin?

Präparationen von *Cannabis sativa* in der Form von Marihuana und Haschisch gehören zu den am weitest verbreiteten illegalen Rauschmitteln weltweit. Die Blüten der weiblichen Pflanzen bezeichnet man als Marihuana; Haschisch ist das von den Pflanzen sezernierte Harz, welches typischerweise in Platten gepresst wird. Über die Gefahren, die vom Cannabiskonsum ausgehen, ist viel diskutiert worden, nicht selten in völliger Ignoranz der wissenschaftlichen Befunde. Je nach politischem Standpunkt werden von Anhängern einer liberalen Drogenpolitik die gesundheitsgefährdenden Eigenschaften verharmlost oder gar negiert, während die Befürworter einer strikten Drogenkontrolle

die entgegengesetzte Position beziehen. Wahrscheinlich sind, wie so oft, beide Positionen falsch und die Wahrheit liegt irgendwo in der Mitte. Marihuana und Haschisch sind sicherlich weniger gefährlich als Alkohol und Tabak, die beide ein sehr hohes Suchtpotenzial haben und jedes Jahr viele Tausend Todesfälle verursachen. Wir wissen aber auch von zahlreichen epidemiologischen Untersuchungen und Langzeitstudien sowie aus Tierexperimenten, dass Cannabispräparate keinesfalls so harmlos sind, wie viele das gerne glauben. Gerade Jugendliche werden durch diese Droge gefährdet (Rubino, Zamberletti und Parolaro 2012). Cannabiskonsum mindert die Intelligenz, reduziert die Leistungsfähigkeit, erhöht das Risiko für psychiatrische Erkrankungen und Cannabis kann süchtig machen! Diese Gefahren dürfen wir nicht ignorieren.