

## Rhodopsinbasierte Optogenetik

# Optogenetischer Werkzeugkasten für neue experimentelle Ansätze

AMELIE BERGS, JANA LIEWALD, ALEXANDER GOTTSCHALK  
UNIVERSITÄT FRANKFURT A. M.

In rhodopsin-based optogenetics the light-activatable cation channel ChR2 is employed to selectively gain control over single neurons. As arising experimental questions become more and more challenging, there is a strong need to further expand the optogenetic toolbox. Along with the discovery of various natural rhodopsins, molecular engineering facilitates the development of custom tools for a variety of applications, ranging from cell culture to light-control of whole organisms like *Caenorhabditis elegans*.

DOI: 10.1007/s12268-019-1069-z  
© Springer-Verlag 2019

■ Im Laufe der Evolution entwickelten zahlreiche Organismen lichtempfindliche Proteine, unter anderem Rhodopsine, um sich an ihre

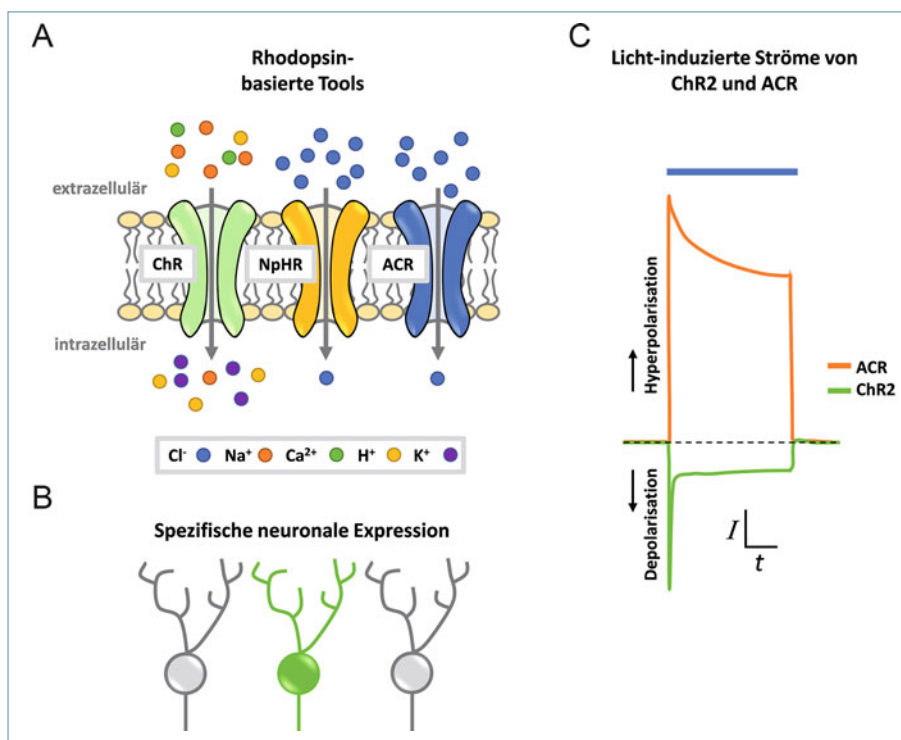
Umgebung anpassen zu können. Eines davon, Channelrhodopsin-2 (ChR2), findet sich im Augenfleck der Alge *Chlamydomonas rein-*

*hardtii* und fungiert als Licht-aktivierbarer Ionenkanal (Abb. 1A, [1]). ChR2 erlaubt es dem Einzeller, optimale Lichtverhältnisse aufzusuchen. Die Entdeckung von Channelrhodopsin im Jahr 2002 ermöglichte die Entwicklung der Optogenetik, also von Methoden, die mithilfe von Licht die Regulation der Aktivität von Zellen erlauben. Diese Anwendungen revolutionierten zunächst die Neurowissenschaften, inzwischen aber auch die Zellbiologie. Durch zellspezifische Expression in der Membran von Muskeln oder Neuronen, können diese mit hoher räumlicher und zeitlicher Präzision durch Licht aktiviert werden (Abb. 1B). Dies erlaubt eine zelltypspezifische, nicht-invasive Aktivierung, im Gegensatz zu den vormals verwendeten Mikroelektroden. Blaulichanregung von ChR2 führt zu einer Isomerisierung des Kofaktors Retinal, der Öffnung des Kanals, einem Kationenstrom in das Zellinnere und damit zur Depolarisierung – also der Aktivierung – der Zelle. Zusammen mit Halorhodopsin, einer mit gelbem Licht aktivierbaren, hyperpolarisierenden (inaktivierenden) Chloridionenpumpe, können so einzelne Neurone über genetisch codierte Lichtschalter selektiv „ein-“ oder „ausgeschaltet“ und die sich daraus ergebenden Effekte (bis hin zu Verhaltensänderungen im intakten Tier) analysiert werden (Abb. 1C).

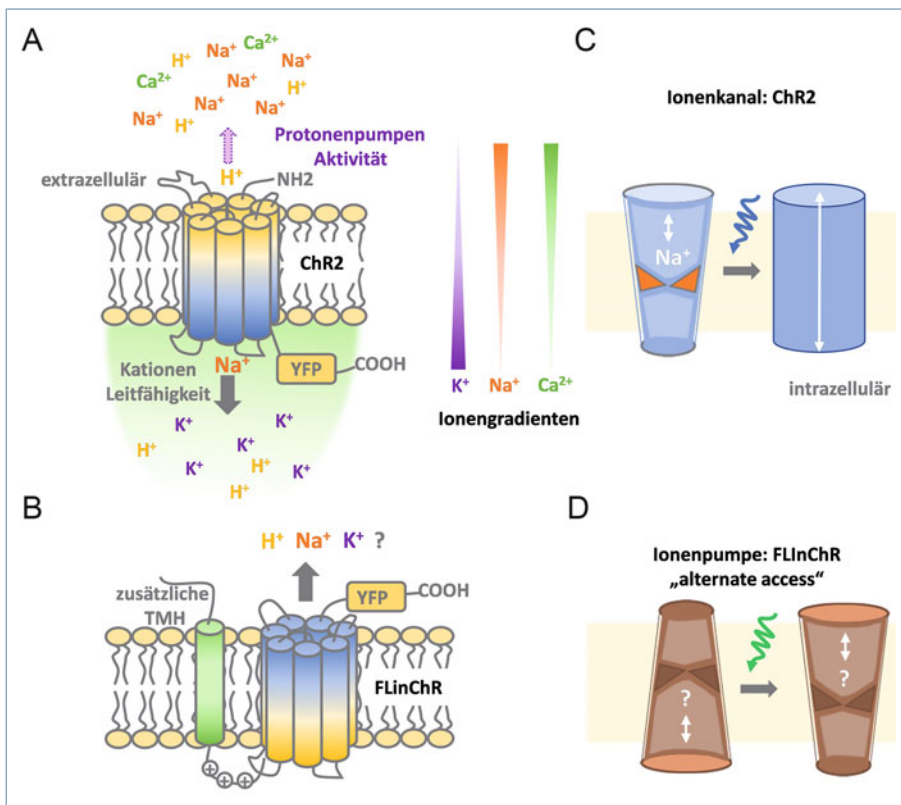
### Erweiterung des Repertoires optogenetischer Werkzeuge

Um immer komplexeren Fragestellungen gerecht zu werden, besteht ein großer Bedarf, das Repertoire an optogenetischen Werkzeugen zu erweitern. Es wurden viele andere natürliche Rhodopsine entdeckt, darunter auch Anionen-Channelrhodopsine (ACRs), die gleichwertig effiziente hyperpolarisierende Rhodopsine darstellen [2]. Sie leiten negativ geladene Chloridionen in das Zellinnere, unterdrücken neuronale Aktivität und sind durch ihre Kanaleigenschaften um ein Vielfaches effizienter als die hyperpolarisierenden Ionenpumpen.

Außerdem werden gezielt künstliche Rhodopsine entwickelt. So konnten z. B. über



▲ **Abb. 1:** Rhodopsinbasierte Optogenetik. **A,** Ionenleitfähigkeit der am häufigsten verwendeten optogenetischen Werkzeuge ChR (Channelrhodopsin), NpHR (Halorhodopsin) und ACR (Anionen-selektives Channelrhodopsin). **B,** Mit zellspezifischen Promotoren kann eine selektive Expression erzielt werden. **C,** Licht-induzierte Ströme in einem elektrophysiologischen *Patch-Clamp*-Experiment.



**▲ Abb. 2:** FlnChR (*full-length inversion of ChR*). **A**, Wildtyp-ChR2 leitet Kationen entlang deren Gradienten ins Zellinnere (Depolarisation), wohingegen das synthetisch durch Invertierung hergestellte Molekül FlnChR Kationen aus der Zelle herauspumpt (Hyperpolarisation). **B**, Eine Licht-induzierte Öffnung des ChR2-Kanals (**C**) steht dem Modell des *alternate access* bei Ionenpumpen gegenüber, bei welchem sich der cytoplasmatische und der extrazelluläre Halbkanal abwechselnd öffnet und schließt (**D**).

strukturbasierte Mutagenese nahe der Retinalbindungsstelle die elektrostatischen Wechselwirkungen im Protein verändert werden, was zu neuer Funktionalität im Hinblick auf Lichtsensitivität, Kinetik, Ionen-selektivität und spektralen Eigenschaften führte [3]. Beispielsweise bleiben die *step-function*-Opsine, bei denen die zentrale Ionenpore im Protein mutiert wurde [4], einmal durch Licht aktiviert deutlich länger im geöffneten Zustand (Minuten bis Stunden). Sie können durch gelb-grünes Licht wieder „ausgeschaltet“ werden. Die Stimulation ist somit nicht auf die Dauer des Lichtsignals begrenzt, was besonders Langzeitexperimenten zugutekommt.

Ein neuartiger Ansatz zur Erweiterung des optogenetischen Werkzeugkastens basiert auf der topologischen Inversion der Rhodopsine. Durch Fusion einer zusätzlichen Transmembranhelix an ChR2 und Einführung positiv geladener Aminosäuren konnte ein in seiner Topologie, aber auch Funktion inverses Protein generiert werden: FlnChR (*full-length inversion of ChR*) transportiert Kationen über

einen Pumpmechanismus aus der Zelle heraus und fungiert somit als Hyperpolarisator (**Abb. 2B**, [5]). Außerdem hat FlnChR ein rot-verschobenes Anregungsmaximum, was bei Experimenten, die zwei komplementär arbeitende Rhodopsine erfordern, hilfreich ist.

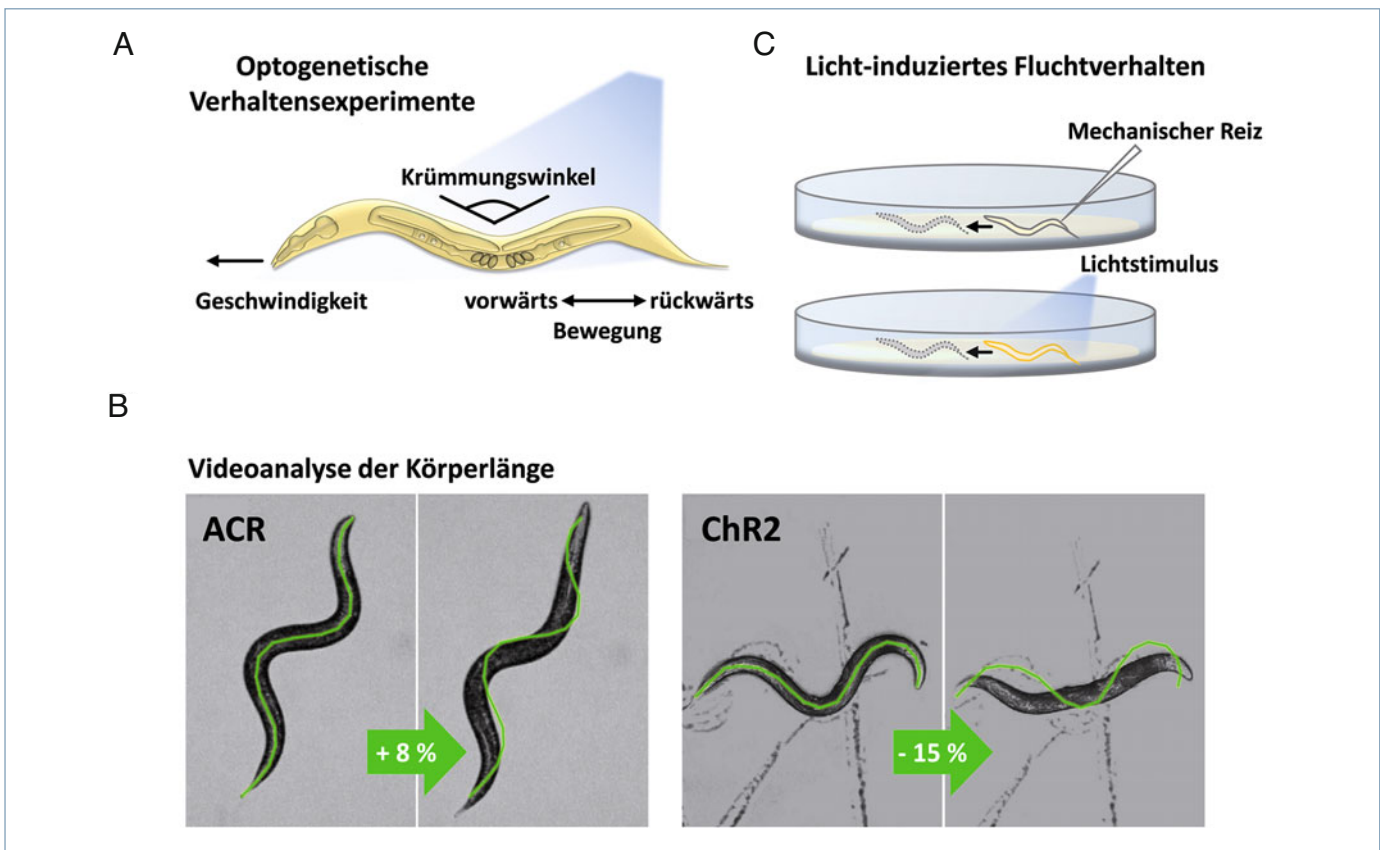
### FlnChR – wie wird aus einem Ionenkanal eine Ionenpumpe?

FlnChR birgt auch das Potenzial, einen mechanistischen Einblick in die Funktion der Rhodopsine zu erhalten. Wie wird durch einfache Inversion eines Ionenkanals seine Funktionalität dermaßen umgestaltet? Wie bewirkt dies eine Veränderung des *gating*-Mechanismus? Die Strukturaufklärung und ein Vergleich mit der ChR2-Struktur könnten Hinweise auf die Unterschiede der beiden Rhodopsinklassen (Kanäle und Pumpen) geben.

Die passive Ionenleitfähigkeit von ChR2 erfordert die simultane Öffnung beider jeweils zur cytoplasmatischen oder extrazellulären Seite ausgerichteten Halbkanäle (**Abb. 2C**). Die Kanaleigenschaft entwickelte sich womöglich aus dem energieabhängigen *alternate access*-Mechanismus von Ionenpumpen, bei denen jeweils nur ein Halbkanal geöffnet ist und ein gerichteter Transport abläuft (**Abb. 2D**). Eine Studie, die die Umwandlung einer Pumpe zu einem Kanal zum Ziel hatte, fand einen Blockierungsmechanismus, der den passiven Ionendurchgang in der Ionenpumpe verhindert [6]. Womöglich wurde dieses Blockierungselement durch strukturelle Umgestaltung in FlnChR, z. B. durch asymmetrische Eigenschaften der Membran, wiederhergestellt. Auch ChR2 weist eine rudimentäre Protonenpumpenfunktion auf (**Abb. 2A**, [7]). Haben Kanäle möglicherweise nie ganz ihre Pumpfähigkeit verloren? Und koexistieren beide Mechanismen in ChR2, während im invertierten FlnChR der Pumpaspekt überhandgenommen hat?

### Laborspezifische Zielsetzungen

Auch ganze Organismen lassen sich nach der Expression von Rhodopsinen über Licht



▲ **Abb. 3:** Optogenetik in *Caenorhabditis elegans*. **A,** Die Analyse der aus Videoaufzeichnungen optogenetischer Verhaltensexperimente gewonnenen Parameter (wie Körperlänge, Geschwindigkeit, Bewegungsrichtung, Biegungswinkel), die z. B. durch ChR2-Aktivierung von Neuronen des Bewegungsapparats beeinflusst werden, lassen Rückschlüsse auf die Funktionsweise des jeweiligen Neurons zu. **B,** Rhodopsinbasierte optogenetische Werkzeuge können auch über Videoanalyse der Körperlänge charakterisiert werden. **C,** Durch ChR2 im nozizeptiven Neuron PVD hervorgerufenen Fluchtverhalten, analog zum mechanischen Reiz.

beeinflussen. In unserem Tiermodell, dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans*, ergünden wir die neuronale Aktivität und das daraus resultierende Verhalten. Wegen der simplen Anatomie mit nur 302 Neuronen, einfachen Verhaltensweisen sowie seiner Transparenz ist *C. elegans* prädestiniert für optogenetische Untersuchungen. Daher war es auch das erste lebende Tier, an dem die Lichtsteuerbarkeit durch ChR2 gezeigt wurde [8].

Durch Licht hervorgerufenen Verhalten werten wir über Videoanalyse aus. Als Parameter dienen z. B. Geschwindigkeit und Richtung der Bewegung sowie Länge und Biegungswinkel des sich schlängelnden Tieres (**Abb. 3A**). Neue Rhodopsine lassen sich auf einfache Weise in Muskeln charakterisieren (**Abb. 3B**, [9]), sie bewirken entweder eine Muskelkontraktion oder -entspannung, was sich in einer geringeren oder vergrößerten Körperlänge widerspiegelt. Komplexere Fragen werden durch Ansteuerung einzelner Neurone adressiert: Zum Beispiel löst ChR2-Aktivierung in dem nozizeptiven Neuron PVD

eine fluchtartige Vorwärtsbewegung aus (**Abb. 3C**), so als wäre das Tier unsanft berührt worden. Durch Verknüpfung von neuronaler Aktivität und Verhalten war es möglich, die Interaktion von PVD mit anderen Neuronen zu verstehen und die beteiligten molekularen Komponenten zu identifizieren [10].

Neben der Ionenleitfähigkeit besitzen einige Rhodopsine auch die Eigenschaft, Veränderungen des Membranpotenzials in ein Fluoreszenzsignal zu übersetzen [11]. So kann die dynamische Aktivität von erregbaren Zellen nachverfolgt werden. Will man zusätzlich ein Neuron optogenetisch über weitere Rhodopsine stimulieren, wird klar, wie wichtig es ist, die Variabilität der Rhodopsin-Werkzeuge zu erweitern. Nur so können spektral gut separierte Moleküle kombiniert werden.

Ein weiteres Anwendungsfeld von Rhodopsinen ist die Untersuchung der Freisetzung von Neurotransmittern an chemischen Synapsen. Dieser Vorgang lässt sich anhand

der synaptischen Morphologie im Elektronenmikroskop untersuchen, wobei Veränderungen durch ChR2-Stimulation hervorgerufen werden. Dauerstimulation führt zur Bildung großer Endosomen, aus denen dann neue synaptische Vesikel gebildet werden. Zumeist kann man dabei nur „Endprodukte“ beobachten, selten jedoch die Bildung der Endosomen. Hier helfen die *step-function*-Opsine. Die Verwendung von Channelrhodopsinen mit unterschiedlichen funktionalen Eigenschaften erlaubt es somit, verschiedenste Fragestellungen im Experiment zu adressieren. ■

## Literatur

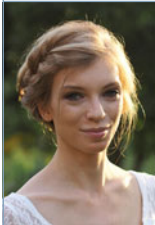
- [1] Nagel G, Ollig D, Fuhrmann M et al. (2002) Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae. *Science* 296:2395–2398
- [2] Govorunova EG, Sineshchekov OA, Janz R et al. (2015) Natural light-gated anion channels: a family of microbial rhodopsins for advanced optogenetics. *Science* 349:647–650
- [3] Hegemann P, Möglich A (2010) Channelrhodopsin engineering and exploration of new optogenetic tools. *Nat Methods* 8:39–42
- [4] Berndt A, Yizhar O, Gunaydin LA et al. (2009) Bi-stable neural state switches. *Nat Neurosci* 12:229–234

- [5] Brown J, Behnam R, Coddington L et al. (2018) Expanding the optogenetics toolkit by topological inversion of rhodopsins. *Cell* 175:1131–1140
- [6] Vogt A, Guo Y, Tsunoda SP et al. (2015) Conversion of a light-driven proton pump into a light-gated ion channel. *Sci Rep* 5:553
- [7] Feldbauer K, Zimmermann D, Pintschovius V et al. (2009) Channelrhodopsin-2 is a leaky proton pump. *Proc Natl Acad Sci* 106:12317–12322
- [8] Nagel G, Brauner M, Liewald JF et al. (2005) Light activation of channelrhodopsin-2 in excitable cells of *Caenorhabditis elegans* triggers rapid behavioral responses. *Curr Biol* 15:2279–2284
- [9] Bergs A, Schultheis C, Fischer E et al. (2018) Rhodopsin optogenetic toolbox v2.0 for light-sensitive excitation and inhibition in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One* 13:e0191802
- [10] Husson SJ, Costa WS, Wabnig S et al. (2012) Optogenetic analysis of a nociceptor neuron and network reveals ion channels acting downstream of primary sensors. *Curr Biol* 22:743–752
- [11] Kralj JM, Douglass AD, Hochbaum DR et al. (2011) Optical recording of action potentials in mammalian neurons using a microbial rhodopsin. *Nat Methods* 9:90–95

#### Korrespondenzadresse:

Amelie Bergs  
 Zelluläre und molekulare Neurobiologie  
 Institut für Biophysikalische Chemie  
 Goethe-Universität Frankfurt a. M.  
 Buchmann Institute for Molecular Life Sciences  
 Max-von-Laue-Straße 15  
 D-60438 Frankfurt a. M.  
 Tel.: 069-798-42713  
 amelie.bergs@stud.uni-frankfurt.de  
 www.bmls.de/Cellular\_and\_Molecular\_Neurobiology/aboutus.html

## AUTOREN



### Amelie Bergs

Jahrgang 1992. 2011–2017 Biochemiestudium an der Universität Frankfurt a. M.; dort seit 2017 Promotionsstudentin (AG Gottschalk).



### Jana Liewald

Jahrgang 1971. 1990–1997 Biologiestudium an der Universität Mainz; dort 2002 Promotion (AG Wegener). 2002–2004 Postdoktorandin am Pharmakologischen Institut, Universität Mainz (AG Nawrath). Seit 2004 Postdoktorandin am Institut für Biochemie, Universität Frankfurt a. M. (AG Gottschalk).



### Alexander Gottschalk

Jahrgang 1969. 1990–1996 Chemiestudium an den Universitäten Frankfurt a. M., Edinburgh, UK, und Marburg. 1999 Promotion an der Universität Marburg (AG Lührmann). 2000–2003 Postdoktorand an der University of California, San Diego, Neurobiologie von *Caenorhabditis elegans*. 2004–2009 Juniorprofessor und seit 2010 Professor an der Universität Frankfurt a. M.