

# Untersuchungen zur Struktur und Funktion von Channelrhodopsinen



Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Vorgelegt von:

**Ronnie Gueta**

geboren in Bad Bergzabern

Würzburg 2012

Eingereicht am: .....

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

1. Gutachter: 1. Prof. Dr. Georg Nagel

2. Gutachter: 2. Prof. Dr. Roland Benz

Tag des Promotionskolloquiums: .....

Doktorurkunde ausgehändigt am: .....

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation in allen Teilen selbst angefertigt und keine anderen, als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ich habe die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form in anderen Prüfungsverfahren vorgelegt. Außerdem habe ich bislang noch keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, 14. August 2012

.....

Ronnie Gueta

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	1
1.2 Rhodopsine .....	2
1.3 Channelrhodopsine .....	4
1.3.1 Photozyklus .....	6
1.3.2 Struktur .....	8
1.3.3 Anwendungen von Channelrhodopsinen .....	10
1.4 Ziele der Arbeit .....	12
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>14</b>
2.1 Chemikalien .....	14
2.2 Mikrobiologische Methoden .....	14
2.2.1 Anzucht und Lagerung von <i>E. coli</i> .....	14
2.2.2 Extraktion von Plasmid DNA .....	14
2.3 Molekularbiologische Methoden .....	15
2.3.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	15
2.3.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR) .....	15
2.3.3 Restriktionsverdau .....	17
2.3.4 Reinigung von DNA-Fragmenten .....	17
2.3.5 Agarosegelelektrophorese (AGE) .....	18
2.3.6 Extraktion von DNA aus Agarosegelen .....	19
2.3.7 Dephosphorylierung .....	19
2.3.8 Ligation .....	19
2.3.9 Ziel gerichtete Mutagenese .....	20
2.3.10 USER-Klonierungsverfahren .....	22
2.3.11 Transformation .....	24
2.3.12 In vitro Transkription (IVT) .....	24
2.4 Arbeiten mit <i>Xenopus laevis</i> .....	25
2.4.1 Haltung .....	25
2.4.2 Entnahme der Oozyten .....	25
2.4.3 Defollikulation .....	26
2.4.4 Injektion .....	26
2.5 Biochemische Methoden .....	27

2.5.1	Membranpräparation .....	27
2.5.2	Polyacrylamid Gel Elektrophorese (SDS-PAGE).....	27
2.5.3	Western Blot.....	28
2.5.4	Detektion .....	28
2.6	Konfokale Laserscanning Mikroskopie (CLSM).....	29
2.7	Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BIFC).....	31
2.8	Elektrophysiologie .....	33
2.8.1	Zwei-Elektroden-Spannungsklemm-Technik (DEVC).....	33
2.8.2	Elektroden und Kapillaren .....	34
2.8.3	Belichtung .....	35
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>36</b>
3.1	Elektrophysiologische Untersuchung von ChR2-Mutanten .....	36
3.1.1	Mutation von C128 und D156.....	37
3.1.2	Schließzeiten .....	37
3.1.3	Öffnungszeiten .....	38
3.1.4	Lichtabhängigkeit.....	40
3.1.5	Beschleunigtes Schließen.....	41
3.1.6	pH-Abhängigkeit.....	42
3.1.7	Expressionsanalysen mittels CLSM.....	44
3.1.8	Ko-Mutation von C128 und D156 .....	45
3.2	Elektrophysiologische Untersuchung von ChR1- Mutanten .....	47
3.2.1	Mutation von C167 und D195.....	47
3.2.2	Expressionsanalysen mittels CLSM.....	49
3.2.3	Kationenselektivität.....	50
3.2.4	Retinalabhängigkeit.....	52
3.3	Interaktion und Struktur .....	54
3.3.1	Immunoblot .....	54
3.3.2	Interaktionsanalysen mittels BIFC .....	55
3.3.3	Koexpression von ChR2 Varianten.....	57
3.3.4	Stromverlauf bei langer Belichtung .....	59
3.3.5	Schließzeiten bei unterschiedlichen Lichtintensitäten .....	61
3.3.6	Quantitative Analyse .....	62
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>66</b>
4.1	Untersuchung von ChR2 Mutanten.....	66

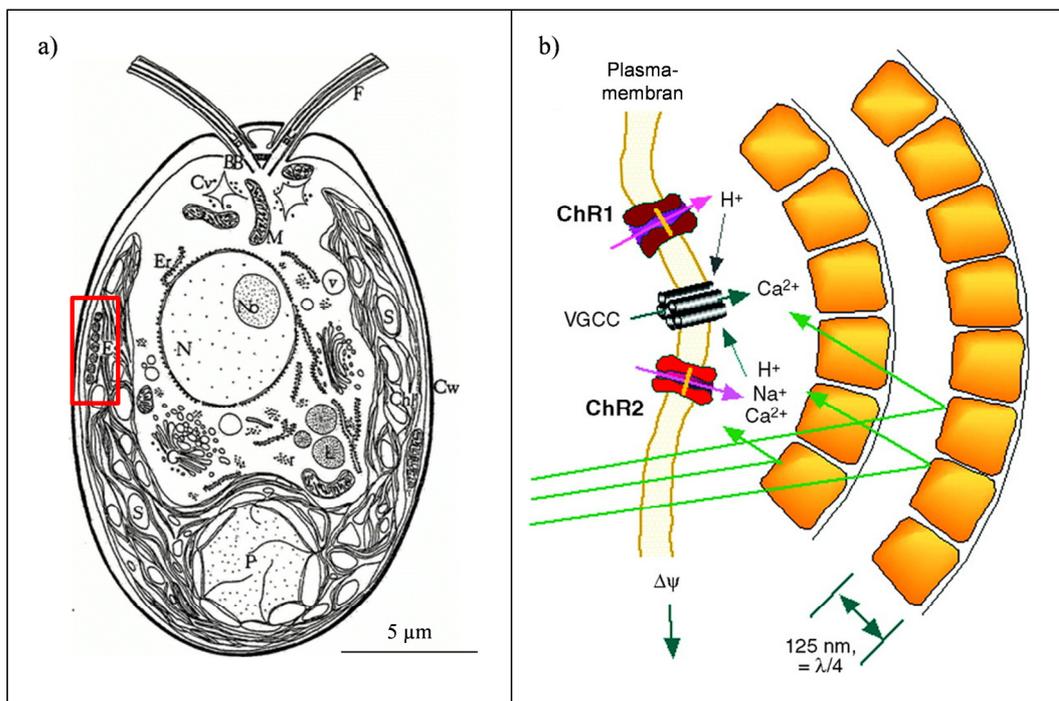
4.1.1	Wasserstoffbrücken in ChR2.....	66
4.1.2	Beschleunigtes Schließen.....	68
4.1.3	pH-Abhängigkeit.....	69
4.1.4	Retinalabhängigkeit.....	71
4.1.5	Mehrfachmutanten.....	72
4.2	Untersuchung von ChR1 Mutanten.....	74
4.2.1	Kinetik.....	74
4.2.2	Ionenselektivität.....	76
4.2.3	Retinalabhängigkeit.....	77
4.3	Strukturelle Untersuchungen.....	78
4.3.1	Strukturanalysen mittels SDS-PAGE.....	78
4.3.2	Interaktionsanalysen über BIFC.....	79
4.3.3	Interaktionsanalysen über DEVC.....	80
4.3.4	Quartärstruktur.....	82
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>84</b>
<b>6.</b>	<b>Summary.....</b>	<b>86</b>
	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>I</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>IX</b>
	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>XII</b>
	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>XIV</b>
	<b>Puffer und Lösungen.....</b>	<b>XVI</b>
	<b>Nukleotidsequenzen.....</b>	<b>XVII</b>
	<b>Vektorkarten.....</b>	<b>XX</b>



# 1. Einleitung

## 1.1 *Chlamydomonas reinhardtii*

Die frei schwimmende Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* ist ein einzelliger eukaryotischer Organismus, dessen Energiebedarf autotroph und heterotroph gedeckt werden kann. *C. reinhardtii* besitzt zwei anterior gelegene Flagellen, einen U-förmigen basalen Chloroplasten, der einen Pyrenoid umschließt und eine Zellwand.



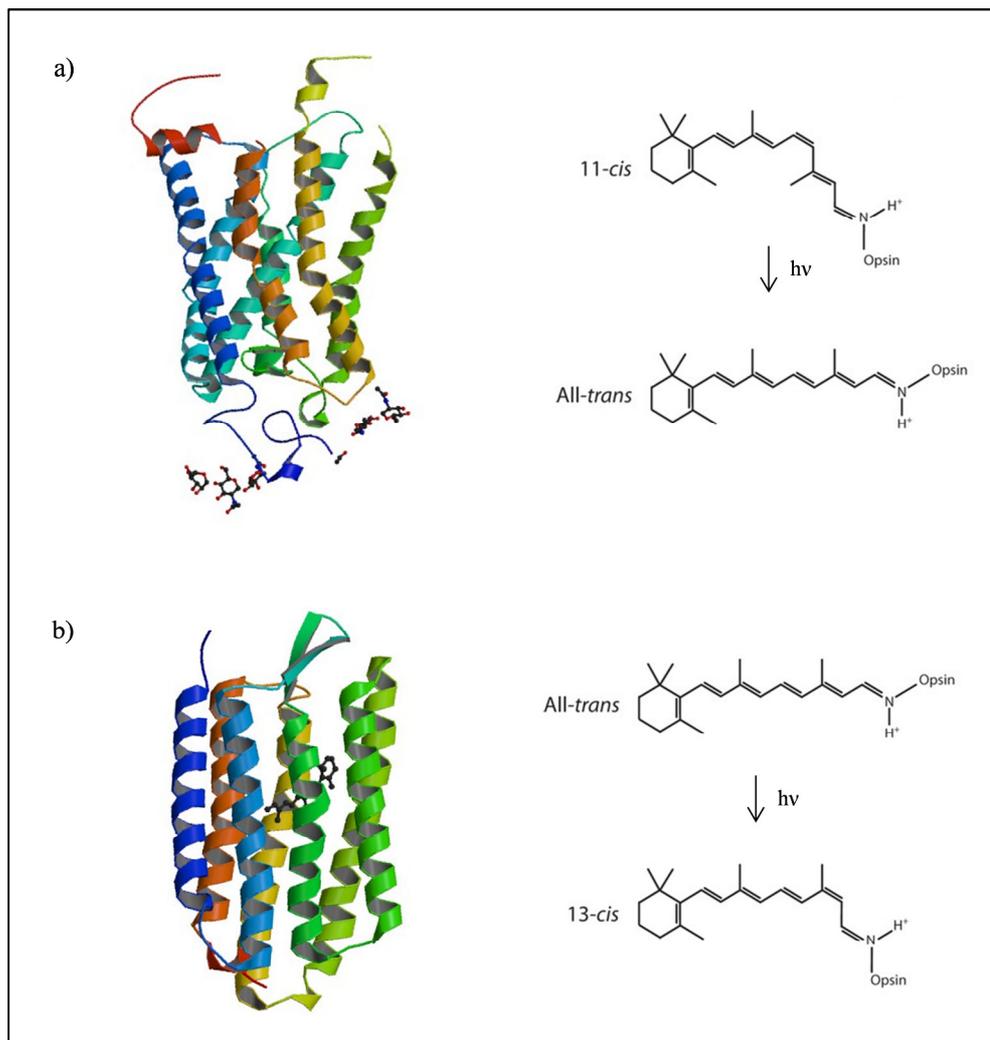
**Abb. 1.1:** Schematische Darstellung von *Chlamydomonas reinhardtii* (a). Die Position des Augenflecks ist rot umrandet. BB, Basalkörper; Chl, Chloroplast; Cv, kontraktile Vakuole; Cw, Zellwand; Er, Endoplasmatisches Reticulum; Es, Augenfleck; F, Flagellen; G, Golgi Apparat; L, Lipidkörper; Mi, Mitochondrien; N, Zellkern; P, Pyrenoid; r, Ribosome; S, Stärke Körner; v, Vakuole. (b) Aufbau des Augenflecks mit Channelrhodopsin 1 (ChR1), Channelrhodopsin 2 (ChR2) und spannungsgesteuerte  $\text{Ca}^{2+}$  Kanäle (VGCC). Potentialänderungen werden an der Membran weitergeleitet und von VGCCs in der Flagellenmembran wahrgenommen. Modifiziert nach Harper (1999) und Kateriya *et al.* (2004).

Nach der vollständigen Sequenzierung des nukleären, mitochondrialen und plastidären Genoms etablierte sich *C. reinhardtii* aufgrund seiner vergleichsweise anspruchslosen Aufzuchtbedingungen als Modellsystem für die Untersuchung von zellulären und organellspezifischen Vorgängen in Eukaryoten. Beispiele hierfür sind die Biogenese und Funktion von Chloroplasten und deren Photosyntheseapparate, der Aufbau der Flagellen und Basalkörper, Stoffwechsel, Nährstoffaufnahme und die zugrundeliegenden Signalwege der zirkadianen Uhr und der Lichtwahrnehmung (Grossman, 2005, 2007; Merchant *et al.*, 2007). Diese erfolgt in *C. reinhardtii* im sogenannten „Augenfleck“ am Rand des Chloroplasten durch ein primitives visuelles System und ermöglicht den Energiegewinn der Photosynthese bei unterschiedlichen Lichtintensitäten durch Bewegung in Richtung der Lichtquelle oder von dieser weg zu maximieren (Phototaxis). Der funktionelle Bereich des Augenflecks besteht aus zwei Lagen carotenoidhaltiger Lipidglobuli, die mit der Thylakoidmembran des Chloroplasten assoziiert sind. Diese Struktur ist mit der äußeren Chloroplasten-Hüllmembran und spezifischen Bereichen der Plasmamembran verbunden, in denen unter anderem die Channelrhodopsin-Proteine eingelagert sind.

## 1.2 Rhodopsine

Rhodopsine sind photoreaktive Proteine in den visuellen Systemen eukaryotischer und prokaryotischer Organismen, deren lichtempfindlicher Bestandteil (Chromophor) das zu den Carotinoiden gehörende Vitamin-A Aldehyd (kurz Retinal) ist. Allen Rhodopsinen gemein ist der Aufbau aus sieben Transmembran Helices, die eine taschenartige Struktur formen in der das Chromophor kovalent gebunden vorliegt. Bei Sequenzvergleichen auf Aminosäureebene teilen sich Rhodopsine in zwei Familien auf, die Typ 1- und Typ 2-Rhodopsine. Obwohl die Proteine aus beiden Gruppen strukturell ähnlich aufgebaut sind, ist keine signifikante Sequenzhomologie feststellbar. Innerhalb der Familien hingegen ist die Homologie mit 25-80 % deutlich höher (Man *et al.*, 2003). Zu der Familie der Typ 1-Rhodopsine zählen die mikrobiellen Rhodopsine, bei denen das Chromophor im Grundzustand in Form von *all-trans*-Retinal vorliegt und nach Lichtabsorption in die angeregte *13-cis* Form isomerisiert. Prominente Beispiele für diese Gruppe sind die

Protonen- und Chloridpumpen Bakteriorhodopsin (BR) und Halorhodopsin (HR) (Oesterhelt, 1998; Haupts *et al.*, 1999; Lanyi, 1999), die in *Halobacterium salinarum* für die Phototaxis wichtigen Transducer-gekoppelten Photorezeptoren Sensory Rhodopsin I und II (SRI, SRII) (Hoff *et al.*, 1997; Spudich, 1998) und die lichtaktivierbaren Ionenkanäle Channelrhodopsin 1 und 2 (ChR1, ChR2) in *C. reinhardtii* (Nagel *et al.*, 2002; Nagel *et al.*, 2003).



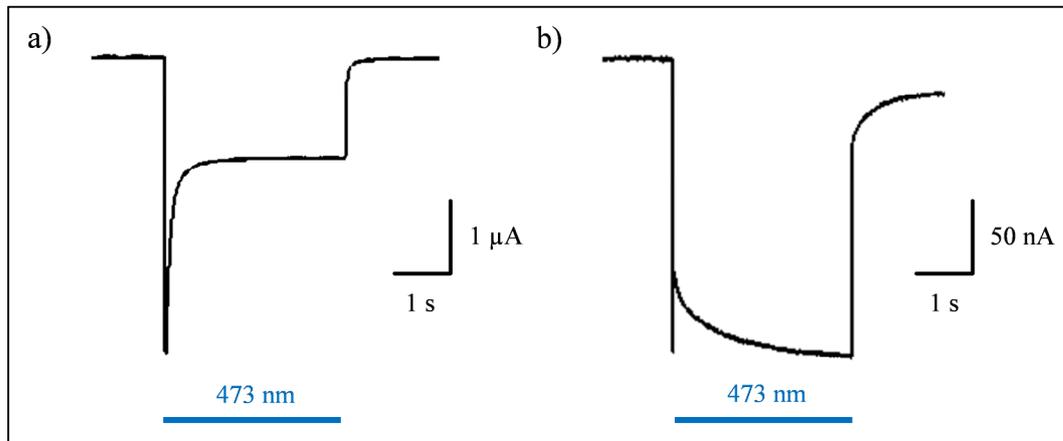
**Abb. 1.2:** Strukturmodelle von Bovinem Rhodopsin (a) und Bakteriorhodopsin aus *Halobacterium salinarum* (b) mit den zugehörigen Chromophoren in Grund- und angeregtem Zustand. Kristallstrukturen übernommen aus Okada *et al.* (2004) und Faham *et al.* (2004)

Die ausschließlich in höheren Eukaryoten zu findenden Typ 2-Rhodopsine sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren in den auf Lichtwahrnehmung spezialisierten Sinneszellen des Wirbeltierauges (beispielsweise Zapfen und Stäbchen im menschlichen Auge). Im Gegensatz zu den mikrobiellen Rhodopsinen liegt bei den Typ 2-Rhodopsinen das Chromophor im nicht angeregten Zustand als 11-*cis* Retinal vor, das nach Belichtung in die all-*trans* Form isomerisiert.

### 1.3 Channelrhodopsine

Channelrhodopsin 1 und Channelrhodopsin 2 sind lichtgesteuerte Ionenkanäle im visuellen System der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*. Die maximale Anregungswellenlänge von ChR2 beträgt 480 nm; bei ChR1 mit 500 nm ist diese leicht rotverschoben. Versuche in gentechnisch veränderten *C. reinhardtii* zeigten, dass bereits die Expression des in Wildtypen in weit größerer Menge vorliegenden ChR1, für phototaktische Reaktionen ausreicht (Sineshchekov *et al.*, 2002; Govorunova *et al.*, 2004; Berthold *et al.*, 2008). Die Funktion von ChR2 im Organismus ist dagegen noch weitgehend ungeklärt.

Wie alle Rhodopsine bestehen auch Channelrhodopsine aus einem Proteingerüst (Opsin) und dem lichtempfindlichen Chromophor all-*trans*-Retinal. Das Apoprotein ist aus sieben Transmembranhelices mit einem extrazellulär gelegenen N-Terminus und intrazellulären C-Terminus aufgebaut. Das Chromophor ist kovalent als Schiff'sche Base an einen Lysin Rest gebunden (K296 in ChR1, K257 in ChR2). Bei beiden Channelrhodopsinen reicht eine Expression der Transmembranbereiche (ChR1 aa 1-347, ChR2 aa 1-315) für die Kanalaktivität aus (Nagel *et al.*, 2002). Die Funktion des hochrepetitiven C-Terminus konnte bisher nicht geklärt werden, vermutet wird eine Beteiligung an der subzellulären Lokalisation des Kanals (Kato *et al.*, 2012).



**Abb. 1.3:** Photostrom von (a) ChR2-WT und (b) ChR1-WT bei einer Belichtung für 5 s. Die Messungen wurden in einer Ringer-Lösung mit einem pH-Wert von 7,6 bei einer Klemmspannung von -100 mV aufgezeichnet. Die Belichtung (blaue Balken) erfolgte durch einen Dioden-gepumpten Festkörperlaser der Wellenlänge 473 nm (8 mW/mm<sup>2</sup>).

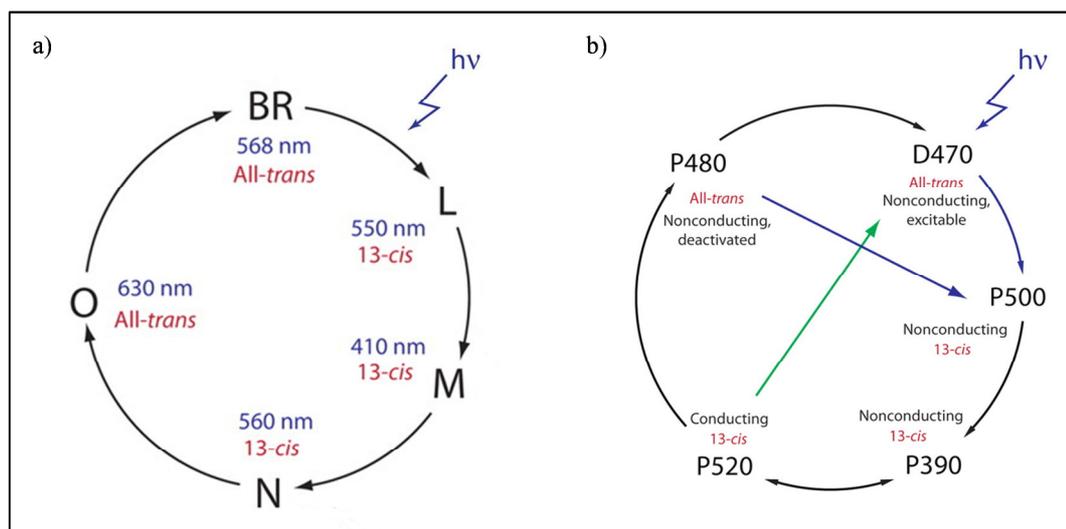
Nach der heterologen Expression beider Channelrhodopsin-Typen in Oozyten von *Xenopus laevis* konnten Nagel *et al.* (2002) und Nagel *et al.* (2003) deren Eigenschaften in elektrischen Messungen genauer untersuchen. Dabei wurde gezeigt, dass ChR2 ein kationenselektiver Ionenkanal ist, der sowohl für mono- als auch divalente Kationen durchlässig ist. ChR1 wurde als ein protonenselektiver Kanal beschrieben; in nachfolgenden Untersuchungen (Berthold *et al.*, 2008; Tsunoda *et al.*, 2009) konnte auch eine Leitfähigkeit für andere Kationensorten nachgewiesen werden. Die unter anderem über Rauschanalysen berechnete Einzelkanalleitfähigkeit von ChR2 liegt mit 50 - 100 fS (Nagel *et al.*, 2003; Bamann *et al.*, 2008; Feldbauer *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2009) deutlich unter der anderer Ionenkanäle.

Nach der Absorption eines Photons öffnet der Kanal und ermöglicht den Einstrom von Kationen über die Membran. Bei kontinuierlicher Belichtung nimmt der zu Beginn auftretende Spitzenstrom aufgrund einer Desensibilisierung um bis zu 60 % auf einen stationären Strom ab, nach dem Abschalten des Anregungslichts schließt der Kanal. Erfolgt innerhalb kurzer Zeit eine zweite Belichtung, ist die Amplitude des Spitzenstroms deutlich verringert während die Höhe des stationären Stroms unverändert bleibt. Erst nach einer

ausreichend langen Dunkelperiode ( $\tau \approx 5$  s) wird die Maximalamplitude des Spitzenstroms wieder erreicht (Nagel et al. 2003).

### 1.3.1 Photozyklus

Bereits bei frühen Arbeiten an BR fiel auf, dass das Protein zwischen zwei Zuständen alterniert, die Licht unterschiedlicher Wellenlängen (568 nm und 400 nm) absorbieren (Oesterhelt *et al.*, 1973). Weitere Untersuchungen zeigten, dass BR eine ganze Reihe solcher Zustände zyklusartig durchläuft. Die Bestandteile dieses Photozyklus wurden als Photointermediate bezeichnet (Stoeckenius *et al.*, 1977). Jedes dieser Photointermediate besitzt unterschiedliche spektrale Eigenschaften und steht für einen Reaktionsschritt des vektoriellen Protonentransports vom intra- in den extrazellulären Raum (Luecke *et al.*, 1999). Durch spektroskopische Untersuchungen an gereinigtem Protein aus *Pichia pastoris* konnte für ChR2 ein Photozyklus erstellt werden, der große Ähnlichkeit mit dem des BR aufweist. Da bei Ionenkanälen kein vektorieller Transport stattfindet, wurden die Photointermediate den kinetischen Zuständen des Kanals zugeordnet (Bamann *et al.*, 2008).



**Abb. 1.4:** Photozyklusmodelle von (a) BR und (b) ChR2. Die Pfeile innerhalb der Zyklen zeigen Reaktionen einzelner Photointermediate (P520, P480) nach Absorption eines zweiten Photons. Modifiziert nach Yizhar *et al.* (2011).

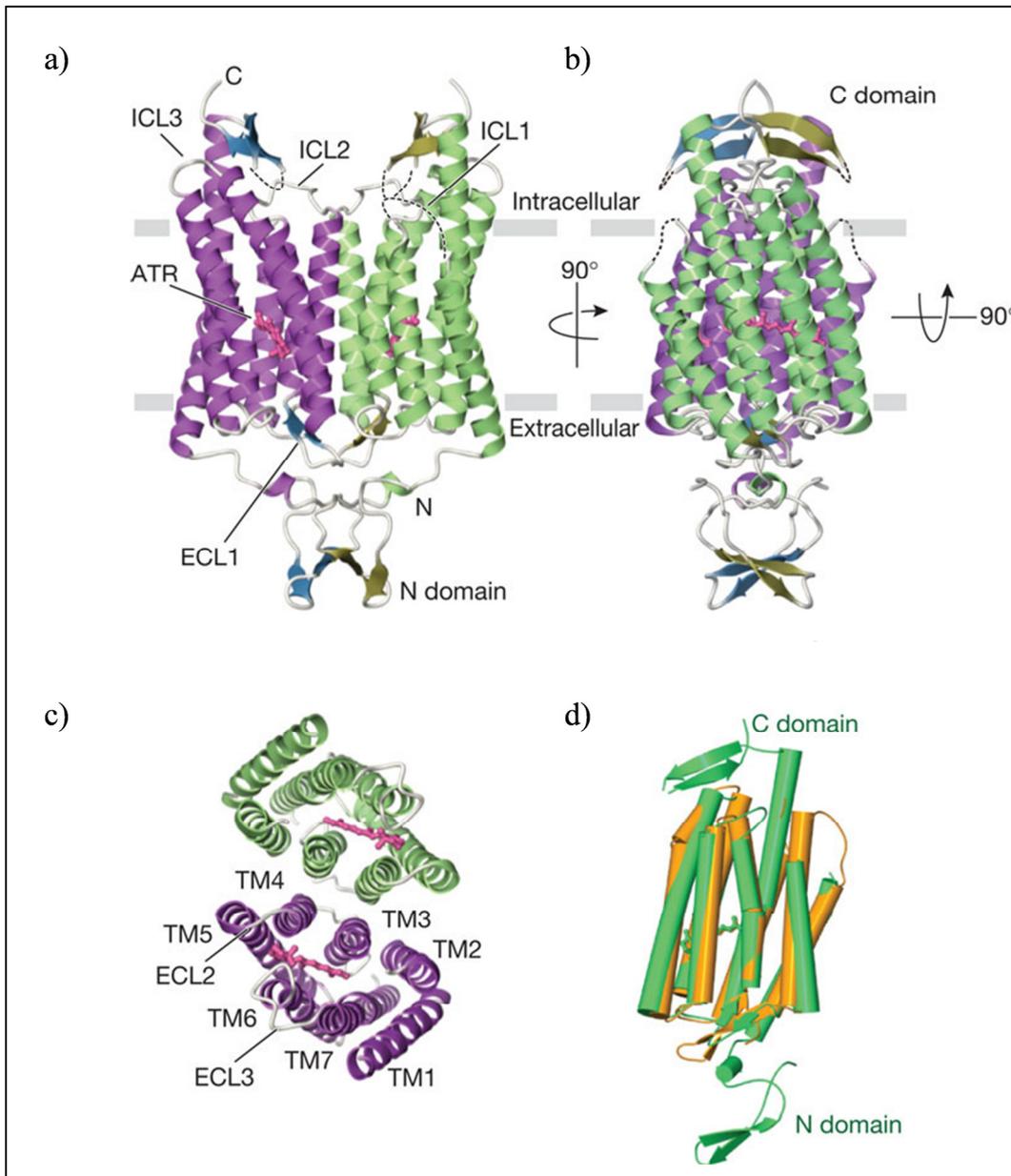
Die Absorption eines Photons führt wie in BR zu einer Isomerisierung des Retinals von der *all-trans* in die *13-cis* Konfiguration (P550 in ChR2 bzw. L-Intermediat in BR). Die veränderte Ladungsverteilung um das Chromophor führt zu der Deprotonierung der Schiff'schen Base (P400 bzw. M-Intermediat in BR) und einer Konformationsänderung innerhalb des Proteins. Nach der Reprotonierung der Schiff'schen Base geht der Kanal in das P520 Intermediat über (N-Intermediat in BR), was in elektrischen Messungen mit dem Öffnen des Kanals korreliert. Parallel zum Schließen des Kanals nimmt auch das P520 Intermediat ab und geht in das P480 Intermediat über, das einen nicht leitenden, nicht anregbaren Zustand darstellt. Nach der Reisisomerisierung des Retinals in die *all-trans* Form (O-Intermediat in BR) und Wiederherstellung des anfänglichen Protonierungszustands ist der Grundzustand D470 wieder erreicht und der Photozyklus einmal durchlaufen.

Der genaue Ablauf des Photozyklus von ChR2 ist noch Gegenstand häufiger Debatten. Im Laufe weiterer Untersuchungen wurden zusätzliche Intermediate, Aufspaltungen und ganze sekundäre Zyklen hinzugefügt, die neue Beobachtungen, wie etwa ein Minuten andauernder nicht anregbarer Zustand, oder kinetische Veränderungen in mutierten Channelrhodopsinen erklären könnten (Bamann *et al.*, 2008; Nikolic *et al.*, 2009; Stehfest *et al.*, 2010; Stehfest *et al.*, 2010; Verhoefen *et al.*, 2010; Bruun *et al.*, 2011). Erschwert wird die Aufklärung durch die Komplexität der ablaufenden Prozesse, hierzu zählen Gleichgewichtsreaktionen zwischen Intermediaten, desensitisierte Zustände, das Überspringen ganzer Photozyklusabschnitte durch zusätzliche Photonenabsorption und die Überlagerung von zeitlich parallelen Photointermediaten in sekundären Zyklen.

### 1.3.2 Struktur

Die Protonenpumpe Bakteriorhodopsin aus *Halobacterium salinarum*, ist neben den homologen sensorischen Rhodopsinen (Hoff *et al.*, 1997) eines der ausführlichst charakterisierten Membranproteine aus der Gruppe der mikrobiellen Rhodopsine. Durch verbesserte Röntgenstrukturanalyseverfahren konnte ein immer höher aufgelöstes Strukturmodell erstellt werden (Grigorieff *et al.*, 1996; Kimura *et al.*, 1997; PebayPeyroula *et al.*, 1997; Essen *et al.*, 1998; Luecke *et al.*, 1998; Takeda *et al.*, 1998; Mitsuoka *et al.*, 1999), das die Grundlage für das Verständnis der zugrundeliegenden funktionellen Mechanismen lieferte. Luecke *et al.* (1999) beschrieben Bakteriorhodopsin als Homotrimer aus 26 kDa großen Untereinheiten. Die aus sieben Transmembranhelices, kurzen interhelikalen Loop-Regionen und extrazellulären N- und C-Termini aufgebauten Protomere bilden eine dicht gepackte Trimerstruktur, die durch Helix-Helix Kontakte und Wasserstoffbrücken stabilisiert wird. Auffallend war die hohe Zahl interhelikaler Interaktionen der Untereinheiten, die die Konformation der Monomere stabilisieren. Diese Tatsache könnte ein Grund dafür sein, dass die Ausbildung der Tertiärstruktur der Monomere unabhängig von der Quartärstruktur ist und der Protonentransport in den Monomeren stattfinden kann (Dencher *et al.*, 1979).

Eine Kristallstruktur von Channelrhodopsinen zu erhalten gestaltete sich schwieriger. Alle bisherigen Arbeiten stützten sich auf Strukturmodelle durch Homologiemodellierung. Erste kristallographischer Analysen von (Muller *et al.*, 2011) auf Basis von Rekonstitutionsexperimenten in synthetischen Lipid-Doppelmembranen lieferten überraschend Hinweise auf eine dimere Proteinstruktur von ChR2 (Abb. 1.1). Dieses vorläufige Ergebnis wurde durch die, von Kato *et al.* (2012) publizierte Kristallstruktur eines chimären Proteins, bestehend aus den Transmembranhelices 1-5 von ChR1 und 6-7 von ChR2 bestätigt.



**Abb. 1.5:** Kristallstruktur der ChR1/ChR2 Chimäre aus drei Blickwinkeln: a) und b) zeigen das Protein in der Seitenansicht aus zwei um 90° gedrehten Blickwinkeln. c) Aufsicht von der extrazellulären Seite. Gekennzeichnet sind intra- (ICL 1-3) und extrazelluläre Schleifen (ECL 1-3), Transmembranhelices (TM1-7) und Chromophor. d) Überlagerung der Transmembranbereiche von C1C2 (grün) und BR (orange). Modifiziert nach Kato *et al.* (2012).

Abgesehen von der Quartärstruktur unterscheiden sich ChR und BR strukturell auch in anderen Bereichen, beispielsweise den im Vergleich zu BR deutlich längeren amino- und

carboxy-terminalen Domänen in ChR. Die N-terminale Domäne beinhaltet drei konservierte Cystein-Reste (C27, C73 und C75), denen durch die Ausbildung von intermolekularen Disulfidbrücken eine Rolle bei der Dimerisierung zugesprochen wird (Kato *et al.*, 2012).

Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass die extrazellulären Helices 1 und 2, im Gegensatz zu den homologen in Bakteriorhodopsin, etwa 3-4 Å nach außen geneigt sind. In Kombination mit Helix 3 und 7 wird so eine Pore gebildet, an deren Oberfläche sich eine hohe Zahl negativ geladener Reste befindet. Eine Schlüsselrolle bezüglich Leitfähigkeit und Ionenselektivität nimmt vermutlich Helix 2 ein, auf der sich die größte Zahl geladener Reste befindet. Die Pore erstreckt sich bis zur Mitte des Proteins und endet auf Höhe des Chromophors. Im Gegensatz zu der offenen, extrazellulären Seite, wird der Zugang auf der intrazellulären Seite an zwei Stellen eingeschränkt. Die erste, weiter außen liegende Begrenzung wird durch die Phenolgruppe eines Tyrosins an Position 109 gebildet, die zweite, in unmittelbarer Nähe der Retinalbindestelle aus einer Reihe von Wasserstoffbrücken zwischen den Aminosäuren S102, E129 und N297. Eine Bewegung der Helices nach einer Isomerisierung des Chromophors könnte eine Destabilisierung dieser Bindungen zur Folge haben und so den Zugang zur Pore öffnen. Kato *et al.* (2012) folgern daraus, dass für die Bildung der Pore eine Untereinheit ausreicht und schließen eine Bildung aus Elementen beider Untereinheiten aus.

### 1.3.3 Anwendungen von Channelrhodopsinen

Wegen der Möglichkeit Zellen durch Licht zu depolarisieren, gewann Channelrhodopsin seit seiner Identifizierung durch (Nagel *et al.*, 2002; Nagel *et al.*, 2003) besonders in der neuronalen Forschung enorm an Bedeutung. Seit es Boyden *et al.* (2005) gelang Channelrhodopsine in Säugetier-Neuronen zu exprimieren und durch Lichtpulse gezielt Aktionspotentiale auszulösen, wurden sie in einer ganzen Reihe tierischer Nervenzellen eingesetzt (Zhang *et al.*, 2007; Kramer *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009; Hagglund *et al.*, 2010; Berndt *et al.*, 2011; Kleinlogel *et al.*, 2011). Im Vergleich zu elektrischen Stimulationsmethoden hat eine Anregung durch Licht enorme Vorteile. Sie ist non-invasiv und kann sowohl fokussiert auf einzelne Zellen, als auch großflächig auf ganze Gewebe

angewendet werden. Ein weiterer Vorteil ist, dass sie Monokomponentensysteme aus Sensor und Effektor sind und eine Zugabe externer Chemikalien oder Kofaktoren bei der Expression in Wirbeltierzellen nicht notwendig ist. Im Gegensatz zu Mehrkomponentensystemen, deren Verwendung hauptsächlich auf Anwendungen *in vitro* beschränkt ist, sind Channelrhodopsine auch für Untersuchungen *in vivo* geeignet (Lin, 2011; Rein *et al.*, 2012).

Der erste Einsatz im lebenden Tier erfolgte parallel durch Li *et al.* (2005) und Nagel *et al.* (2005). Wurde ChR2 transgen in cholinergen Motorneuronen von *C. elegans* exprimiert, konnten bei Belichtung mit Blaulicht Muskelkontraktionen ausgelöst werden (Nagel *et al.*, 2005). In Hühnerembryonen ermöglichte transient exprimiertes ChR2 die bidirektionale Kontrolle der Rückenmarksaktivität (Lin, 2011). Der erste Einsatz in Zebrafischen durch Douglass *et al.* (2008) konnte zeigen, dass bereits eine kurze Anregung der Trigeminal-Nerven ausreicht, um einen Fluchtreflex auszulösen. Wang *et al.* (2007) verwendeten transgene Thy1-ChR2-YFP Mäuse für die Kartierung der neuronalen Organisation in der Großhirnrinde. In zahlreichen weiteren Untersuchungen konnten durch die Verwendung von ChR2 Zusammenhänge zwischen neuronaler Aktivität und Verhaltensweisen von Nematoden, Mäusen und Ratten aufgedeckt werden (Nagel *et al.*, 2005; Gradinaru *et al.*, 2009; Tsai *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2010).

Eine der interessantesten Anwendungen von Channelrhodopsinen in naher Zukunft ist ihr Einsatz bei der Behandlung humaner Erkrankungen. Verhältnismäßig naheliegend ist die Wiederherstellung des Sehvermögens bei Degenerationserkrankungen der Netzhaut. Zu diesem Zweck wurden Channelrhodopsine bereits bei blinden Mäusen auf zwei verschiedenen Wegen mit vielversprechenden Ergebnissen eingesetzt. Eine Möglichkeit ist eine nicht selektive Expression in den Photorezeptorzellen der Netzhaut, eine andere die Promotor vermittelte spezifische Expression in ON Bipolarzellen der Retina (Bi *et al.*, 2006; Lagali *et al.*, 2008).

Ein anderes Einsatzgebiet ist die Tiefen-Hirnstimulation bei motorischen und psychomotorischen Erkrankungen wie Morbus Parkinson oder dem Tourette-Syndrom (Gradinaru *et al.*, 2009). Die Expression von Channelrhodopsinen in den betroffenen

Gebieten würde die Verwendung von Lichtstimuli zur Anregung erlauben und könnte so die bisher eingesetzte elektrische Stimulation mittels Neuroprothesen ersetzen. Auch klassische psychische Erkrankungen wie Depressionen könnten so behandelt werden.

Eine vielversprechende Behandlungsmethode bei Patienten mit Lähmungen oder Muskelerkrankungen ist die elektrische Stimulation peripherer Nerven. Ein großer Nachteil dieser sich noch im experimentellen Stadium befindlichen Therapie ist die hohe Ermüdungsanfälligkeit der Patienten aufgrund der Aktivität antagonistischer Muskelgruppen bei der Anregung mittels Elektroden (Rein *et al.*, 2012). Durch die Expression von Channelrhodopsinen in ausgewählten Nervenzelltypen des Gewebes könnte eine gezieltere Stimulation der motorischen Einheiten gewährleistet werden. Ein ähnlicher Ansatz wäre im Rahmen der Behandlung spastischer Lähmungen denkbar (Llewellyn *et al.*, 2010).

Ein weiteres Beispiel für das breite Anwendungsspektrum ist die elektrische Stimulation von Herzmuskelzellen. Das Prinzip der lichtinduzierten Anregung von Nervenzellen konnte von Bruegmann *et al.* (2010) erfolgreich auf Kardiomyozyten übertragen werden. Channelrhodopsine könnten daher auch im kardiologischen Bereich wichtige Werkzeuge bei der Erforschung der Ursachen und Behandlung von Herzrhythmusstörungen sein und zukünftig möglicherweise sogar Schrittmacherfunktionen übernehmen.

#### **1.4 Ziele der Arbeit**

Die immer größer werdende Zahl veröffentlichter Arbeiten, in denen Channelrhodopsine in verschiedensten Bereichen eingesetzt werden, verdeutlicht das Potential dieser Proteine für die biotechnologische und neurowissenschaftliche Forschung. Allerdings müssen aufgrund seiner physikalischen Eigenschaften auch Einschränkungen bei ihrem Einsatz berücksichtigt werden.

Ein wichtiger Schritt auf dem Weg zur therapeutischen Anwendung von Channelrhodopsinen wäre die Erhöhung der Lichtempfindlichkeit. Zusätzlich zu der

Tatsache, dass bisher starke Lichtquellen wie LEDs oder Laser für die Anregung eingesetzt werden mussten, war eine hohe Expression in den Zellen notwendig. Ein lichtsensitiveres Protein würde auch bei geringer Expression den gewünschten Effekt erzielen. In diesem Zusammenhang könnte auch eine Erhöhung der Einzelkanalleitfähigkeit eine Rolle spielen. Durch Veränderungen weiterer physikalischer Parameter wie Ionenselektivität, maximaler Anregungswellenlänge und Kinetik könnten Channelrhodopsin-Varianten hergestellt werden, die auf die jeweilige Anwendung optimiert sind. Ein Ziel der Arbeit war es diese Parameter durch gezielte Mutation des Kanals zu verändern und ein besseres Verständnis der zugrunde liegenden funktionellen Mechanismen zu erlangen.

Außerdem sollte, da zu Beginn dieser Arbeit keine Kristallstruktur von Channelrhodopsin vorlag, die Konformation und, im Falle eines oligomeren Aufbaus, die Bindungskräfte zwischen den Untereinheiten genauer untersucht werden. Diese Informationen würden die Auswahl von Mutationsstellen in Zukunft erheblich erleichtern und so eine wichtige Rolle bei der Herstellung von „Designer“-Channelrhodopsinen spielen.

.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Chemikalien**

Chemikalien und Biochemikalien wurden von den Firmen Sigma (Deisenhofen), Fluka (Neu-Ulm), Applichem und Roth bezogen. Bei speziellen Chemikalien, die von anderen Firmen bezogen wurden, sind diese im Text angegeben.

### **2.2 Mikrobiologische Methoden**

#### **2.2.1 Anzucht und Lagerung von *E. coli***

Zur Anzucht von Bakterien wurde eine auf einer LB-Agar-Platte gewachsene Kolonie bzw. 10 µl einer LB-Flüssigkultur in 5 ml LB-Medium überführt und ca. 16 h in einem Inkubator (G25 Incubator, New Brunswick Scientific) bei 37 °C geschüttelt. Nach einer Transformation wurden 5 µl des Reaktionsansatzes auf einer LB-Agar-Platte mit 50 µg/ml Ampicillin ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Für die langfristige Lagerung von Bakterienklonen wurden Permanentkulturen angesetzt. Hierzu wurden 400 µl Bakteriensuspension (OD 580nm > 1,8) mit 400 µl einer 80%igen sterilisierten Glycerol-Lösung versetzt und bei -80 °C gelagert.

#### **2.2.2 Extraktion von Plasmid DNA**

Für die Extraktion von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen wurde eine 10 minütige Präparation nach Zhou *et al.* (1990) verwendet. 2 ml einer dicht gewachsenen Bakteriensuspension (OD580nm > 1,5) wurden für 30 s bei maximaler Geschwindigkeit in einer Tischzentrifuge (Eppendorf) pelletiert und der Überstand bis auf 50 µl Restvolumen verworfen. Nach Resuspension des Bakterienpellets durch Vortexen, wurden die Zellen durch Zugabe von 300 µl TENS-Puffer und mehrmaligem Invertieren aufgeschlossen. Dabei freiwerdende mRNA und rRNA wurde durch den Zusatz von 1 mg/ml RNase entfernt. Die Lyse-Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von 150 µl einer 3M Na-

Acetatlösung (pH 5,2) gestoppt. Zelltrümmer, lösliche Proteine und Histon-gebundene genomische DNA wurden durch Zentrifugation für 5 Minuten mit 14000 rpm pelletiert. Nach der Überführung des Überstands in ein neues Reaktionsgefäß wurden 500 µl Isopropylalcohol zugegeben, wodurch die Plasmid-DNA präzipitierte und durch eine 10 minütige Zentrifugation mit 14000 rpm bei 4 °C pelletiert wurde. Das Pellet wurde mit 500 µl 70 %igem Ethanol überschichtet, für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand verworfen. Verbliebener Ethanol wurde durch Trocknung für 15 Minuten bei 37 °C entfernt, das Pellet in 50 µl TE-Puffer resuspendiert und bei -20 °C gelagert.

Sollte die Reinheit für eine anschließende Sequenzierungsreaktion erhöht werden, wurde die in Wasser gelöste DNA mittels eines Mini-Plasmidextraktions-Kits der Firma Promega nach Vorschrift aufbereitet und in 20 µl TE-Puffer aufgenommen.

### **2.3 Molekularbiologische Methoden**

#### **2.3.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

DNA- und RNA-Konzentrationen wurden photometrisch über die Absorption bei 260 nm mit einem Photometer (NanoPhotometer™, Implen, München, Deutschland) ermittelt. Die Bestimmung der Reinheit erfolgte über den Quotient der Absorption bei 260 nm und 280 nm, das Probenvolumen betrug 1 µl.

#### **2.3.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR)**

Für die Amplifikation von DNA-Abschnitten *in vitro* wurde die PCR (Polymerase Ketten Reaktion) nach Mullis *et al.* (1986) verwendet. Hierbei wird in einem ersten Schritt ein DNA-Doppelstrang durch Erhitzen auf 98 °C in zwei Einzelstränge getrennt (Denaturierung). Anschließend lagern sich synthetisch hergestellte, kurze DNA-Fragmente mit einer Länge von 15 bis 30 bp (Primer) an die N- und C-Termini des zu amplifizierenden Bereichs (Annealing) und dienen als Startpunkte für eine enzymatische Reaktion, bei der die Einzelstränge mit einer DNA-Polymerase zu Doppelsträngen ergänzt

werden. Diese können nach erneuter Denaturierung ihrerseits als Matrize für eine Primer-Anlagerung dienen. Der Zyklus wird ca. 30-mal wiederholt; die Vervielfältigung erfolgt exponentiell. Die Zusammensetzung eines PCR-Reaktionsansatzes ist in Tab. 2.1 dargestellt.

**Tab. 2.1:** Ansatz einer PCR: die eingesetzte Menge an DNA-Template hängt ebenso wie die Annealingtemperatur von der Anwendung ab

Reagenz	eingesetzte Menge
5×HF-Puffer	10 µl
dNTPs (je 10 µM)	1 µl
Matrizen-DNA	50-100 ng
Primer fwd. (10 µM)	2,5 µl
Primer rev. (10 µM)	2,5 µl
DNA-Polymerase	1 µl
<i>ddH<sub>2</sub>O</i>	ad 50 µl

Als Polymerase wurde eine PhusionCX High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes) eingesetzt. Die Reaktion wurde in einem Thermocycler der Firma Finnzymes nach dem in Tab. 2.2 aufgeführten Reaktionsprotokoll durchgeführt.

**Tab. 2.2:** Ablauf einer PCR-Reaktion. Die Annealingtemperatur hängt von Länge und Zusammensetzung der Primersequenzen ab.

Zyklen	Temperatur	Zeit
1	98 °C	5 min
	98 °C	20 s
35	55-70 °C	20 s
	72 °C	2 min
1	72 °C	4 min

Zusätzlich konnten im Laufe einer PCR-Reaktion über Primer Schnittstellen für nachfolgende Restriktionsansätze an das zu amplifizierende DNA-Stück angebracht werden; die Primersequenzen wurden in einem solchen Fall entsprechend modifiziert

### 2.3.3 Restriktionsverdau

Sollte für die Herstellung von Mutanten DNA-Fragmente (Insert) in Plasmide inseriert werden, wurden sowohl Plasmid als auch Insert mit kompatiblen Restriktionsstellen versehen (2.3.2) und mittels geeigneter Restriktionsenzyme geschnitten. In einem 50 µl Reaktionsansatz wurden etwa 1 µg DNA mit 5 µl Enzym-spezifischem Puffer versetzt und 1U Restriktionsenzym zugegeben.

**Tab. 2.3:** Ansatz eines Restriktionsverdaus

Reagenz	eingesetzte Menge
10x Puffer	5 µl
DNA	10 µg
Restriktionsenzym	25 U
ddH <sub>2</sub> O	ad 50 µl

Der Ansatz wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert und die Restriktion mittels DNA Agarosegelelektrophorese überprüft.

### 2.3.4 Reinigung von DNA-Fragmenten

Sollten enzymatisch geschnittenen DNA-Stücke für Ligations- oder *in vitro*-Translationsreaktionen eingesetzt werden, mussten zuvor Enzyme, Puffer und Salze aus dem Ansatz entfernt werden. Die Reinigung erfolgte mittels eines minElute-PCR-Reinigungskits der Firma Qiagen und wurde nach Vorschrift durchgeführt. Die gereinigte DNA wurde in 15 µl TE-Puffer aufgenommen und die Konzentration photometrisch bestimmt.

### 2.3.5 Agarosegelelektrophorese (AGE)

Zur Überprüfung von PCR-Produkten, *in vitro* synthetisierter RNA und zur Trennung von DNA-Fragmenten nach einem Restriktionsverdau wurde die Agarose-Gelelektrophorese verwendet. Bei DNA-Proben wurde 1g Agarose in 100 ml 1x TAE-Puffer durch Kochen vollständig gelöst und der Nukleinsäurefarbstoff GelGreen™ zugegeben. Die flüssige Gellösung wurde in einen Gelschlitten mit Kamm gegossen. Nach dem vollständigen Erkalten wurde das Gel in eine mit 1x TAE gefüllte Laufkammer überführt und die mit DNA-Probenpuffer versetzten Proben aufgetragen. Als Größenmarker diente eine mit dem Restriktionsenzym PstI verdaute  $\lambda$ -Phagen-DNA ( $\lambda$ -PstI Marker).

**Tab. 2.4:** Zusammensetzung der Puffer für DNA- und RNA-Gelelektrophorese

10xTAE		10xMEN	
Tris	0,4 M	MOPS	0,1 %
Eisessig 99 %	11,4 % (v/v)	Na-Acetat	50 mM
EDTA	10 mM	EDTA	5 mM
In <i>ddH</i> <sub>2</sub> O	pH 7,6	In <i>ddH</i> <sub>2</sub> O	pH 7,0

Für die gelelektrophoretische Trennung von RNA nach Thurston *et al.* (1988) wurden die RNA-Proben mit einer Lösung aus 10 % DMSO und 8 % Glyoxal (Endkonzentration in den Proben) versetzt und durch Erhitzen auf 60 °C für 30 Minuten denaturiert. Nach Zugabe von 2x RNA-Probenpuffer wurde die RNA bis zum Auftragen auf Eis gehalten. Für das RNA-Agarosegel wurden zu 20,5 ml 1x MEN-Puffer 0,25 g Agarose und der Nukleinsäurefarbstoff GelRed™ (10,000x in DMSO) gegeben und aufgeköcht. Nach Abkühlung auf ca. 60 °C wurden 4,5 ml einer 37 %igen Formaldehydlösung zugegeben und die Gellösung in einen Schlitten mit Kamm gegossen. Nach dem Aushärten des Gels wurden die Proben aufgetragen, als Größenmarker wurde eine RiboRuler High Range RNA Ladder (Fermentas) eingesetzt.

**Tab. 2.5:** Zusammensetzung der DNA- und RNA-Probenpuffer

5xDNA-Probenpuffer		2xRNA-Probenpuffer	
Bromphenolblau	0,25 %	Bromphenolblau	0,1 %
Xylencyanol	0,25 %	Xylencyanol	0,1 %
EDTA	100 mM	EDTA	40 mM
Glycerin	50 %	Glycerin	20 %

Der Gellauf erfolgte sowohl bei DNA- als auch RNA-Gelelektrophorese bei einer angelegten Spannung von 100 V für 30 Minuten. Die Gelbanden wurden in einem Gelimager unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert.

### 2.3.6 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Für die Extraktion von DNA aus Agarosegelen wurde ein Gelextraktions-Kit (MinElute Gel Extraction Kit, Qiagen) verwendet. Die DNA wurde in 11 µl DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### 2.3.7 Dephosphorylierung

Sollte ein DNA-Fragment in ein Plasmid, das nur mit einem Enzym linearisiert wurde eingebracht werden, wurden die 5' Enden der Plasmid-DNA durch Behandlung mit einer Phosphatase (SAP, Shrimp-Alkaline-Phosphatase) dephosphoryliert. Eine Rezirkulation des leeren Plasmids konnte somit verhindert werden. Ein 20 µl Ansatz bestehend aus 1 µg linearisierter DNA, 2 µl 10x Reaktionspuffer und 1 µl alkalischer Phosphatase (1 U) wurde mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz gereinigt und die dephosphorylierte Plasmid-DNA in 20 µl ddH<sub>2</sub>O eluiert.

### 2.3.8 Ligation

Für die enzymatisch katalysierte Insertion gelelektrophoretisch getrennter, gereinigter DNA-Fragmente in Vektoren mittels einer T4-DNA-Ligase wurde der in Tab. 2.6 gezeigte Reaktionsansatz verwendet.

**Tab. 2.6:** Ansatz einer Ligationsreaktion

Reagenz	eingesetzte Menge
10x Ligasepuffer	2 $\mu$ l
DNA (Vektor)	1 $\mu$ g
DNA (Insert)	5x Menge an Vektor
T4-DNA Ligase	2 U
<i>ddH2O</i>	ad 20 $\mu$ l

Der Ansatz wurde über Nacht bei 16 °C inkubiert. Anschließend wurden chemisch kompetente MRF'-Zellen mit 10  $\mu$ l des Ligations-Ansatzes transformiert (2.3.11).

### 2.3.9 Ziel gerichtete Mutagenese

Für die elektrophysiologische Untersuchung von Channelrhodopsinen in Oozyten von *Xenopus laevis* wurden Mutanten von ChR1 und ChR2 hergestellt. Mittels gerichteter *in vitro* Mutagenese (QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kit, Stratagene) wurden Mutationen an definierten Positionen der DNA-Sequenz eingeführt. Ähnlich einer PCR-Reaktion wird in einem ersten Schritt ein doppelsträngiger Vektor, der den zu mutierenden Sequenzabschnitt beinhaltet bei 98 °C denaturiert. Anschließend hybridisieren zwei, synthetisch hergestellte Oligonukleotid-Primer, die die gewünschte Mutation tragen mit den komplementären Sequenzen des Vektors. In der Elongationsphase werden die nach den Primern gelegenen, einzelsträngigen Sequenzabschnitte durch eine DNA-Polymerase in 5'→ 3' Richtung verlängert. In mehreren Zyklen entstehen somit zirkuläre, die zu verändernde Sequenz beinhaltende DNA-Doppelstränge, mit einem kurzen einzelsträngigen Bereich vor den 5'-Enden der Primer. Nach der Transformation in MRF'-Zellen werden diese Stellen durch die bakterieneigenen Mismatch-Reparatur-Systeme erkannt und zum Doppelstrang ergänzt. Die Amplifikation erfolgt im Gegensatz zu einer exponentiell ablaufenden, konventionellen PCR-Reaktion linear, da nur bei Bindung der Primer an das Ausgangsplasmid ein vollständiger DNA-Strang gebildet werden kann.

**Tab. 2.7:** Ansatz einer Mutagenese-Reaktion. Die eingesetzte Templatemenge hängt von der Konzentration des Ausgangsmaterials ab.

Reagenz	eingesetzte Menge
5× HF-Puffer	10 µl
dNTPs (je 10 µM)	1 µl
Primer fwd. (10 µM)	2 µl
Primer rev. (10 µM)	2 µl
Template-DNA	500 ng
<i>PhuCX</i> DNA-Polymerase	1 µl
<i>ddH</i> <sub>2</sub> O	ad 50 µl

Die in Tab. 2.7 aufgeführten Bestandteile wurden in einem 0,2 µl-Reaktionsgefäß gemischt und in einem Thermocycler (Primus25, MWG-Biotech) nach dem in Tab. 2.8 beschriebenen Protokoll inkubiert. Zur Kontrolle wurden 10 µl des Ansatzes abgenommen und gelelektrophoretisch überprüft.

**Tab. 2.8:** Ablauf einer PCR-basierten Mutagenesereaktion.

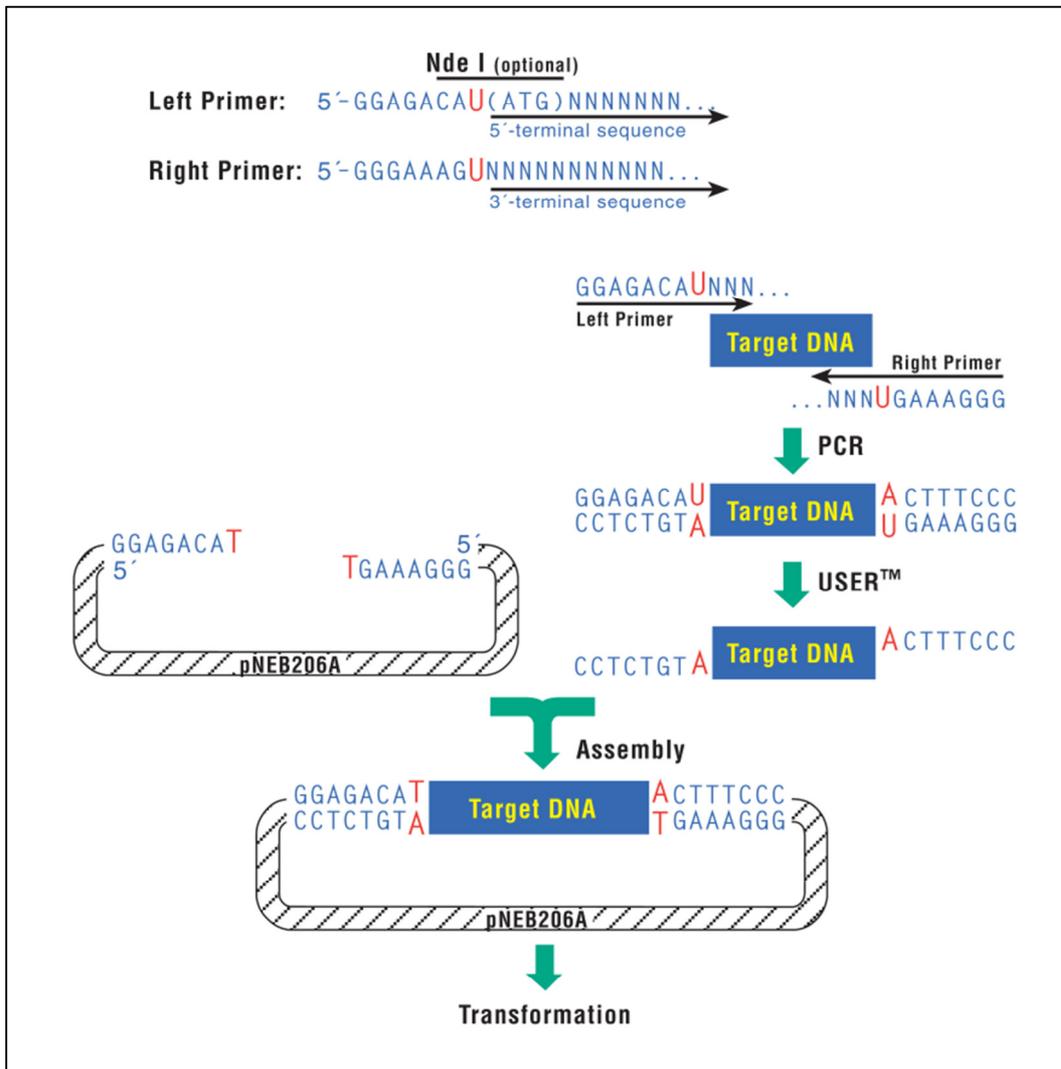
Zyklen	Temperatur	Zeit
1	98 °C	2 min
	98 °C	1 min
21	55 °C	45 s
	72 °C	2 min 30 s
1	72 °C	3 min

Bei einem positiven Resultat wurden zur Entfernung des Matrizenvektors 10 µl mit 10 U des Restriktionsenzym DpnI versetzt und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Da die Aktivität dieser Endonuklease auf methylierte bzw. hemi-methylierte DNA beschränkt ist, bleiben im Gegensatz zu der, aus Bakterien extrahierten methylierten Ausgangs-DNA ausschließlich die nicht methylierten Produkte der DNA-Polymerase erhalten. Anschließend wurden 5 µl des Restriktionsansatzes in kompetente MRF'-Zellen transformiert. Um den positiven Verlauf der Mutagenese zu überprüfen, wurde der kodierende Plasmidabschnitt einzelner Klone sequenziert. Bei einer Insertion von

Restriktionsschnittstellen über gerichtete Mutagenese wurde zusätzlich ein Restriktionsverdau mit dem entsprechenden Enzym durchgeführt.

### **2.3.10 USER-Klonierungsverfahren**

Die in den BIFC-Experimenten verwendeten Expressions-Vektoren pNBIu-ChR1-/ChR2-YFP<sup>N</sup> bzw. pNBIu-ChR1-/ChR2-YFP<sup>C</sup> wurden mittels des USER-Klonierungsverfahren (uracil-specific excision reagent) nach Geu-Flores *et al.* (2007) und Nour-Eldin *et al.* (2010) hergestellt. Die Bildung der einzelsträngigen DNA-Überhänge (sticky ends) an dem zu inserierenden DNA-Fragmentes (Insert) erfolgt hierbei nicht durch Restriktionsendonukleasen, sondern über eine Behandlung mit einer Mischung aus zwei Enzymen. Der schematische Ablauf der Reaktion ist in Abb. 2.1 dargestellt.



**Abb. 2.1:** Schematischer Ablauf einer USER Klonierungsreaktion. Modifiziert nach USER™ Friendly Cloning Kit-Handbuch (New England Biolabs)

Während der ersten Reaktion erfolgt eine Abspaltung der Pyrimidin- und Ribosebestandteile (Depyrimidierung) eines stromaufwärts des Inserts gelegenen Uracilrestes, durch eine DNA Glycosylase (UDG). In einem zweiten Schritt wird das exponierte Phosphodiestergerüst durch das Enzym Endo-VII DNA-glycosylase/lyase gespalten, was die Ablösung von bis zu elf, stromaufwärts des Uracilrestes gelegenen, Basen zu Folge hat. Im Gegensatz zu den meisten Restriktionsendonukleasen sind die hierbei entstehenden Überhänge nicht palindromisch und können mit komplementären

Vektorüberhängen ohne Zugabe einer DNA-Ligase gerichtet zu einem Doppelstrang hybridisieren.

Für die Amplifikation des Inserts mit einem integrierten Uracilrest wurde eine PCR-Reaktion mit modifizierten Primern durchgeführt. Nach dem Entfernen der Matrizen-DNA durch eine Behandlung des Ansatzes mit 2 U des Restriktionsenzym DpnI wurden 10 µl PCR-Produkt mit 20 ng linearisiertem Zielvektor und 1 U USER-Enzymmix in ein Reaktionsgefäß transferiert und für 20 min bei 37 °C und 20 min bei 20 °C inkubiert. Der komplette Ansatz wurde in chemisch kompetente MRF<sup>+</sup> Zellen transformiert und auf Ampicillin-haltigen LB-Platten ausgestrichen.

### **2.3.11 Transformation**

Für die Transformation chemisch kompetenter Zellen wurden 50 µl einer auf Eis aufgetauten Bakteriensuspension mit 5 µl eines Ligations- oder Mutageneseansatzes versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 45 s auf 42 °C erwärmt und erneut für 3 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 250 µl LB-Medium wurde der Ansatz für 30 min bei 37 °C geschüttelt, komplett auf mit Antibiotikum versetzten LB-Agarplatten ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht gelagert.

### **2.3.12 In vitro Transkription (IVT)**

Die in Oozyten von *Xenopus laevis* injizierte RNA wurde mittels eines In vitro-Transkriptionskits der Firma Epicentre hergestellt. Der Ansatz einer IVT-Reaktion ist in Tab. 2.9 dargestellt. Als Matrize diente ein zuvor mit dem Restriktionsenzym NheI linearisiertes Plasmid mit der kodierende Sequenz des zu untersuchenden Proteins und einem stromaufwärts gelegenen viralen T7-Promotor. Dieser wird von den im Enzym-Mix enthaltenen RNA-Polymerasen erkannt und die Transkription eingeleitet.

**Tab. 2.9:** Ansatz einer *in vitro* Transkription

Reagenz	eingesetzte Menge
10x Transcription Buffer	2 $\mu$ l
DNA (linearisierter Vektor)	1 $\mu$ g
Cap/NTP PreMix	8 $\mu$ l
DTT (100 mM)	2 $\mu$ l
T7 Enzyme Mix	2 $\mu$ l
DEPC-H <sub>2</sub> O	ad 20 $\mu$ l

Der in Tab. 2.9 dargestellte Ansatz wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert und die RNA durch Zugabe von 20  $\mu$ l Ammoniumacetat (3 M) und Lagerung für mindestens 20 min bei -20 °C präzipitiert. Anschließend wurde der Ansatz für 1 h bei 4 °C zentrifugiert (14000 rpm), der Überstand verworfen und das Pellet mit 700  $\mu$ l 70 %igem Ethanol überschichtet. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (14000 rpm) für 5 min bei Zimmertemperatur wurde der Überstand abgenommen und im Ansatz verbliebener Ethanol durch Trocknung bei 37 °C entfernt. Das Pellet wurde in 15  $\mu$ l DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen und die Konzentration der RNA sowohl photometrisch (2.3.1), als auch gelelektrophoretisch (2.3.5) überprüft.

## 2.4 Arbeiten mit *Xenopus laevis*

### 2.4.1 Haltung

Die nachfolgend beschriebenen elektrophysiologischen Messungen wurden ausschließlich in Eizellen (Oozyten) des südafrikanischen Krallenfroschs *Xenopus laevis* durchgeführt. Etwa 60 weibliche Frösche wurden in Gruppen zu je 5 Exemplaren unter artgerechten, kontrollierten Bedingungen gehalten.

### 2.4.2 Entnahme der Oozyten

Für die Entnahme der Oozyten aus *Xenopus laevis* wurde ein Individuum in einem gesonderten Becken mit 1,5 l Leitungswasser und 0.2 % (w/v) des Lokalanästhetikums

Ethyl 3-Aminobenzoat Methansulfonat (Tricain) narkotisiert. Nach der vollständigen Betäubung des Frosches für ca. 30 min wurde dieser mit der Bauchdecke nach oben auf eine mit Eis gefüllte Schale platziert und mit Tricainlösung getränkten Zellstofftüchern bedeckt. Mit einem sterilisierten Skalpell wurde ein 5 - 10 mm langer Schnitt in die Bauchhaut und dem darunterliegenden Muskelgewebe durchgeführt. Anschließend wurde ein Teil eines Ovarlappens mit einer Pinzette entnommen und bis zur weiteren Verwendung in einer ND96-Lösung mit Gentamycin aufbewahrt. Die Schnitte wurden mit einem sterilen nichtresorbierbaren, monofilen Polyesterfaden genäht und der Frosch nach dem Aufwachen in frischem Leitungswasser (etwa 2 h) zurück gesetzt. Die nächste Entnahme wurde frühestens nach 6 Monaten Rekonvaleszenz durchgeführt, in dieser Zeit konnten neue Eizellen produziert werden.

#### **2.4.3 Defollikulation**

Nach der Operation wurde der Ovarlappen mechanisch in 2 - 3 mm<sup>2</sup> große Stücke zerteilt und zwei Mal mit einer Calcium-freien Ringerlösung gewaschen. Die Defollikulation erfolgte enzymatisch für 1,5 h unter Schütteln in einer Calcium-freien ND96-Lösung mit 5 mg/ml Kollagenase NB 4 aus *Clostridium histolyticum*. Nach dem Verdau wurden die Oozyten drei Mal mit einer Calcium-haltigen ND96-Lösung gewaschen und in einer 10 cm Petrischale bei 16 °C bis zur RNA-Injektion aufbewahrt.

#### **2.4.4 Injektion**

Die Injektion der cRNA wurde mit einem Nanoliter-Injektor (Nanoject; Drummond Scientific Company) durchgeführt. Die hierfür verwendeten Injektionskapillaren (3.511 Drummond #3-000-203-G/X; Drummond Scientific Company) wurden in einem vertikalen Puller (PC-10; Narishige) in zwei Zügen bei einer Heizleistung von 86,1 und 58,6 gezogen. Anschließend wurden die Spitzen der ausgezogenen Kapillaren unter dem Mikroskop auf einen äußeren Durchmesser von ca. 25 µm abgebrochen.

## 2.5 Biochemische Methoden

### 2.5.1 Membranpräparation

Die Extraktion von Gesamtmembran aus Oozyten wurde wie in Bissonnette *et al.* (2007) beschrieben durchgeführt. Fünf Oozyten wurden in 1 ml ND96-Lösung mit zugesetztem Protease Inhibitor (cOmplete ULTRA Tablets, Roche) homogenisiert und bei 4 °C mit 250 g für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß transferiert und bei 4 °C mit 16000 g für 20 Minuten zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands, wurde das Membran-Pellet in 10 µl ORi-Lösung resuspendiert und bis zur weiteren Probenaufarbeitung bei -20 °C gelagert.

### 2.5.2 Polyacrylamid Gel Elektrophorese (SDS-PAGE)

Zur biochemischen Untersuchung von Channelrhodopsinen unter oxidierenden und reduzierenden Bedingungen wurde die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) mit modifizierten Probenpuffern eingesetzt. Das in Tab. 2.10 angegebene Probenvolumen der hergestellten Membranfraktionen wurden mit 2 µl reduzierendem bzw. oxidierendem Probenpuffer (Tab. 2.10) versetzt und für 5 Min. bei 95 °C (reduzierende Bedingungen) bzw. 60 °C (oxidierende Bedingungen) denaturiert.

**Tab. 2.10:** Zusammensetzung des reduzierenden bzw. oxidierenden SDS-PAGE Probenpuffers

2x Probenpuffer oxidierend	2x Probenpuffer reduzierend
100 mM Tris-Cl (pH 6.8)	100 mM Tris-Cl (pH 6.8)
4 % (w/v) SDS	4 % (w/v) SDS
0,2 % (w/v) Bromphenolblau	0,2% (w/v) Bromphenolblau
20 % (v/v) Glycerol	20 % (v/v) Glycerol
-	200 mM DTT

Die Auftrennung der Proben im elektrischen Feld erfolgte auf einem 10 %igen Acrylamidgel bei einer konstanten Stromstärke von 20 mA in einem SDS-Laufpuffer (50 mM Tris, 0,38 M Glycin, 0,1 % (w/v) SDS). Als Größenreferenz wurde der

Molekulargewichtsmarkern PageRuler™Plus Prestained (Fermentas) verwendet. Falls kein Western-Blot durchgeführt werden sollte, wurde das Gel nach erfolgter Elektrophorese mit einer Coomassie-Brillant Blue R 250 Lösung gefärbt und fotografiert.

### **2.5.3 Western Blot**

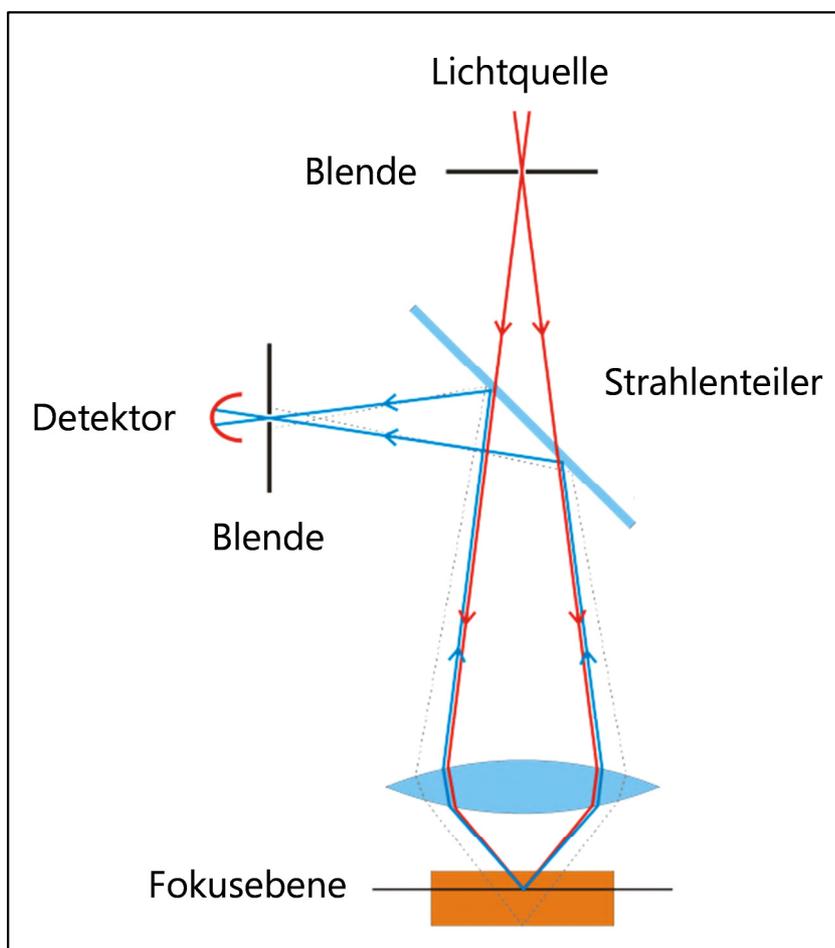
Für den immunologischen Nachweis der Rhodopsinproteine wurden Western-Blots mit gegen GFP gerichteten Antikörpern (Kaninchen-Anti-GFP, abcam) durchgeführt. Die Übertragung der im SDS-Gel getrennten Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF) erfolgte in einer Wet-Blot-Apparatur bei einer konstanten Spannung von 100 V für 45 min. Freie Bindestellen auf der Membran wurden durch eine 2-stündige Inkubation in 1x TBST, 5 % Magermilchpulver und 3 % BSA abgesättigt. Der primäre Antikörper wurde in 10 ml 1x TBST mit 5 % Magermilchpulver verdünnt (1:2000) und auf der Membran über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für 10 min mit 1x TBST-Puffer gewaschen und der sekundäre Antikörper (Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper mit gekoppelter Meerrettich-Peroxidase, Promega) in einer 1:20000 Verdünnung in 1x TBST zugegeben. Nach Inkubation für 1 h auf einem Schüttler bei Zimmertemperatur wurde erneut dreimal für 10 min mit 1x TBST gewaschen.

### **2.5.4 Detektion**

Die Anfärbung erfolgte über die Umsetzung Luminols (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific), durch ein an den sekundären Antikörper gekoppeltes Meerrettich-Peroxidase-Enzym. Die mit dem primären Antikörper interagierenden Proteine konnten im Anschluss auf einem Röntgenfilm als dunkle Banden sichtbar gemacht werden.

## 2.6 Konfokale Laserscanning Mikroskopie (CLSM)

Sowohl die Quantifizierung der Expression über die Intensität des YFP-Fluoreszenzsignals als auch Interaktionsstudien mittels BIFC wurden an einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM) durchgeführt. Im Gegensatz zur konventionellen Fluoreszenzmikroskopie erlaubt die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie die Abbildung einer einzelnen Bildebene eines Objekts (optischer Schnitt).



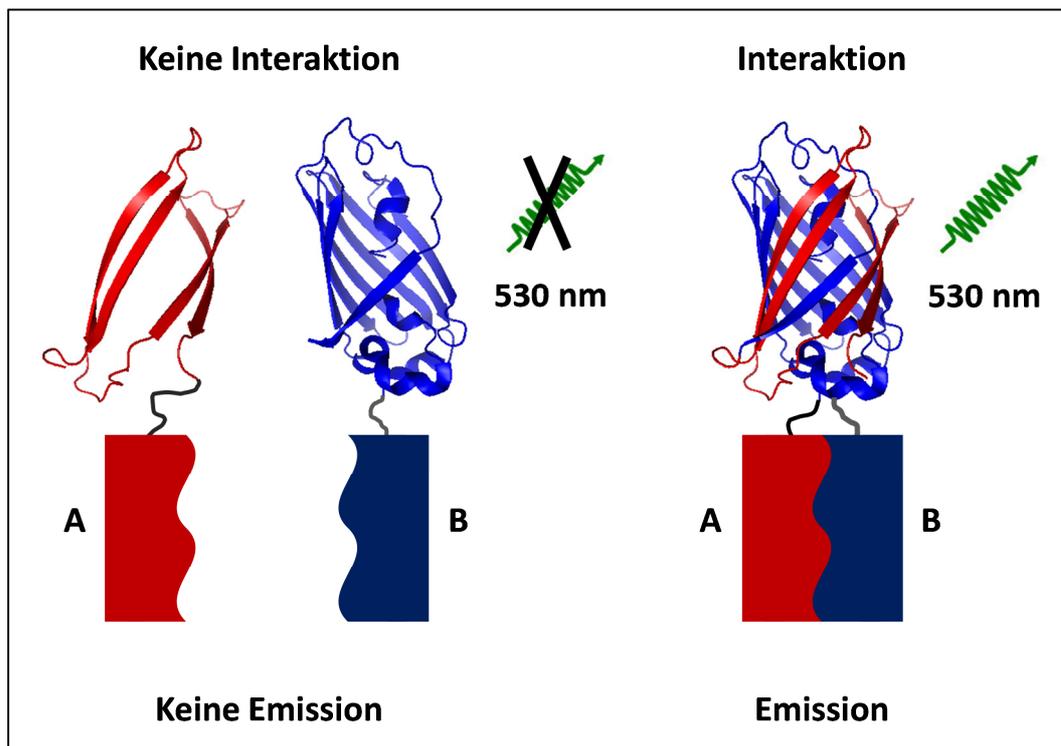
**Abb. 2.2:** Schematische Darstellung eines konfokalen Laser Scanning Mikroskops. Das Anregungslicht wird über eine Lochblende, einen dichromatischen Spiegel und verschiedene Linsensysteme auf das Präparat geleitet. Das Fluoreszenzlicht der Probe passiert den dichromatischen Spiegel und gelangt durch eine zweite Lochblende (pinhole) zum Photodetektor. Beide Lochblenden sind konfokal, was eine hohe Bildauflösung ermöglicht (Paddock, 2000).

Hierbei wird in einem ersten Schritt ein Laserstrahl auf das Präparat fokussiert und auftretendes Streulicht durch wellenlängenspezifische Strahlteiler gefiltert. Durch eine Blende (Pinhole), deren Durchmesser angepasst werden kann, wird im zweiten Schritt Licht der Fokusebene von dem der ober- und unterhalb gelegenen Bereiche separiert und mit einem optischen Detektor nachgewiesen. Der Laserstrahl rastert nach diesem Funktionsprinzip das komplette Präparat ab, es wird also ein Punkt-zu-Punkt-Abbild ausschließlich der Strukturen, die sich in der Fokusebene befinden erstellt. Durch eine Abfolge von Aufnahmen, bei denen das Objekt schrittweise in z-Richtung verschoben wird, kann ein tiefenscharfes Bild angefertigt werden, das Informationen über die Ausdehnung und Verteilung von Elementen innerhalb des Präparates liefert.

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen erfolgte die Anregung bei 514 nm mittels eines Argonlasers bei 25 % Maximalleistung, was der maximalen Anregungswellenlänge des verwendeten Fluorophors (YFP) entspricht. Die Öffnungsweite der Lochblende (Pinhole) wurde auf 200  $\mu\text{m}$  festgesetzt.

## 2.7 Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BIFC)

Die Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BIFC) ermöglicht es Protein-Protein-Interaktionen in lebenden Zellen zu visualisieren (Kerppola, 2009). Hierbei werden zwei komplementäre, getrennt nicht fluoreszierende, Hälften einer Variante eines fluoreszierenden Proteins, an potentielle Interaktionspartner fusioniert und gemeinsam exprimiert. Bei der Interaktion der fusionierten Proteine findet eine Komplementation beider Hälften durch allosterische Wechselwirkung zum funktionsfähigen Fluorophor und eine Emission von Fluoreszenzlicht statt. In dieser Arbeit wurde das N- und C-terminale Fragment (Aminosäuren 1-155 bzw. 156-237) eines Venus-YFP (Literatur) Proteins verwendet, das bei einer 514 nm Anregung mit einer Wellenlänge von 530 nm fluoresziert (s. Abb. 2.3).



**Abb. 2.3: Schematische Darstellung des BIFC-Verfahrens.** An die Proteine A und B wird das C- und N-terminale Fragment eines YFP-Proteins fusioniert. Bei keiner Interaktion zwischen A und B bleiben beide Fluorophorhälften getrennt und funktionslos. Nach der Interaktion der Proteine A und B gelangen die Fragmente in räumliche Nähe und eine Komplementation mit Fluoreszenzlichtemission findet statt.

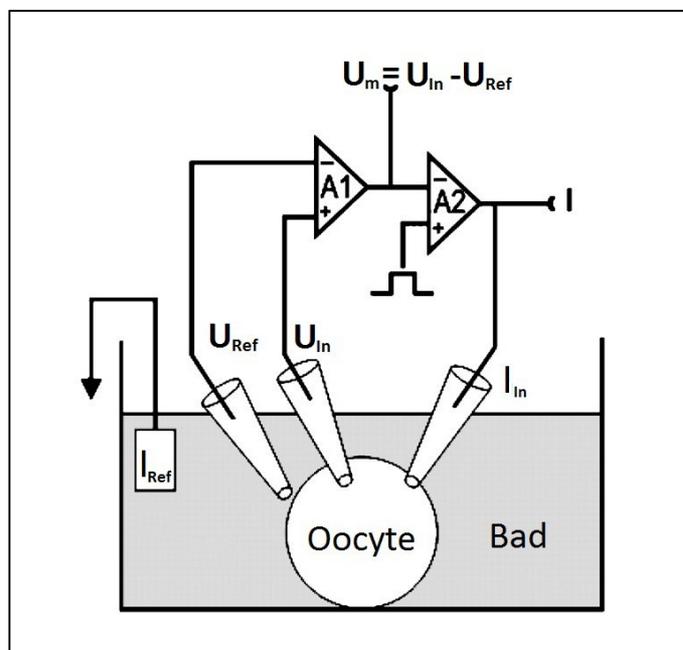
Für die Herstellung der notwendigen Plasmide wurde das für ChR1 bzw. ChR2 kodierende DNA-Fragment über das USER-Klonierungssystem in die entsprechenden Zielvektoren inseriert. Die hierfür verwendeten Primersequenzen sind im Anhang aufgeführt.

Jeweils 10 ng RNA der zu untersuchenden Interaktionspartner (Gesamtmenge 20 ng) und der notwendigen Kontrollen wurde in Oozyten von *Xenopus laevis* injiziert und in retinalhaltiger Ringerlösung inkubiert. Nach dreitägiger Expression wurden die Oozyten fluoreszenzmikroskopisch auf das Auftreten eines YFP-Signals hin untersucht.

## 2.8 Elektrophysiologie

### 2.8.1 Zwei-Elektroden-Spannungsklemm-Technik (DEVC)

Für die Untersuchung der Channelrhodopsin-Kanäle wurde die Zwei-Elektroden-Spannungsklemmtechnik (DEVC, *engl.* Double Electrode Voltage Clamp) angewendet. Hierbei werden über zwei, in *Xenopus*-Oozyten eingestochene Mikroelektroden (Spannungs- und Stromelektrode) elektrische Ströme bei einem festgelegten („geklemmten“) Membranpotential aufgezeichnet.



**Abb. 2.4: Schema einer TEVC-Messung an Oozyten.** Dargestellt sind die, in die Oozyte eingestochenen Strom- und Spannungselektroden ( $I_{In}$  bzw.  $U_{In}$ ), der Vorverstärker (A1) und der Differenzverstärker (A2). Die Zelle befindet sich mit den Referenzelektroden ( $I_{Ref}$  und  $U_{Ref}$ ) in der Badlösung (Bad). Die vorgegebene Spannung  $U_{Soll}$  wird durch einen Rechteckpuls gekennzeichnet. Modifiziert nach Nagel *et al.* (2005).

Die Zelle und die zugehörigen Referenzelektroden befinden sich in einer Badlösung, deren Zusammensetzung die elektrischen und chemischen Eigenschaften des äußeren Mediums darstellen. Das Membranpotential  $U_m$  der Oozyte wird kontinuierlich, als Differenz zwischen dem Potential im Zellinneren  $U_{In}$  (Spannungselektrode) und dem Badpotential  $U_{Ref}$  (Referenzelektrode in der Badlösung) aufgezeichnet. Der ermittelte Wert wird über

einen Vorverstärker (A1) an einen Differenzverstärker (A2) weitergeleitet an dem der, vom Anwender festgelegte Sollwert  $U_{\text{soll}}$  mit der gemessenen Membranspannung  $U_m$  verglichen wird. In einem separaten Stromkreis wird über die Stromelektrode solange Strom appliziert ( $I_{\text{In}}$ ), bis die gemessene Membranspannung der vorgegebenen entspricht. Über diesen Strombetrag  $I_{\text{In}}$  können Spannungsänderungen an der Oozytenmembran aufgezeichnet werden.

Der Differenzverstärker wurde über einen Digital-Analog-Wandler (Nidaq MX) durch einen Computer mit unterschiedlichen Spannungsprotokollen angesteuert. Die Zelle wurde zwischen den Spannungssprüngen bei einer Spannung von  $-40 \text{ mV}$  gehalten. Die Spannungsprotokolle wurden mit der Software WinEDR (University of Strathclyde) programmiert. Aufgezeichnete Daten wurden mit den Programmen Clampfit 9.0 (Axon Instruments), WinEDR (University of Strathclyde), OriginPro 8.5G (OriginLab Corporation) und Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation) ausgewertet.

### **2.8.2 Elektroden und Kapillaren**

Die bei der Zwei-Elektroden-Spannungsklemm-Technik eingesetzten Mikroelektroden bestanden aus einem Silberdraht als metallischem Leitmaterial an dem durch Elektrolyse in einer  $3 \text{ M KCl}$ -Lösung eine Silberchloridschicht angebracht war. Die Referenzelektrode der Stromelektrode war in unmittelbarer Nähe der Oozyte in der Badlösung angebracht. Für die Referenzelektrode der Spannungselektrode wurde der Silberdraht in einen Kunststoffschlauch mit  $3 \text{ M KCl}$ -Lösung gegeben, und mit einem Pfropfen aus  $1 \%$  Agarose in  $3 \text{ M KCl}$  vom Badmedium abgeschirmt um Änderungen des Potentials an den Kontaktflächen bei Lösungswechseln zu verhindern

Für die Herstellung der Glaselektroden wurden mit einem Filament versehene Kapillaren aus Borosilikatglas ( $\varnothing=1,5 \text{ mm}$ , Wandstärke  $0,178 \text{ mm}$ ; Hilgenberg) in zwei Zügen in einem in einem vertikalen Puller (PC-10; Narishige) bei einer Heizleistung von  $86,1$  und  $58,6$  gezogen und mit einer  $3 \text{ M KCl}$ -Lösung mit  $0,1 \%$  Agarose luftblasenfrei gefüllt. Die Widerstände der eingesetzten Strom- und Spannungselektrode lagen zwischen  $0,5 \text{ M}\Omega$  und  $1 \text{ M}\Omega$ .

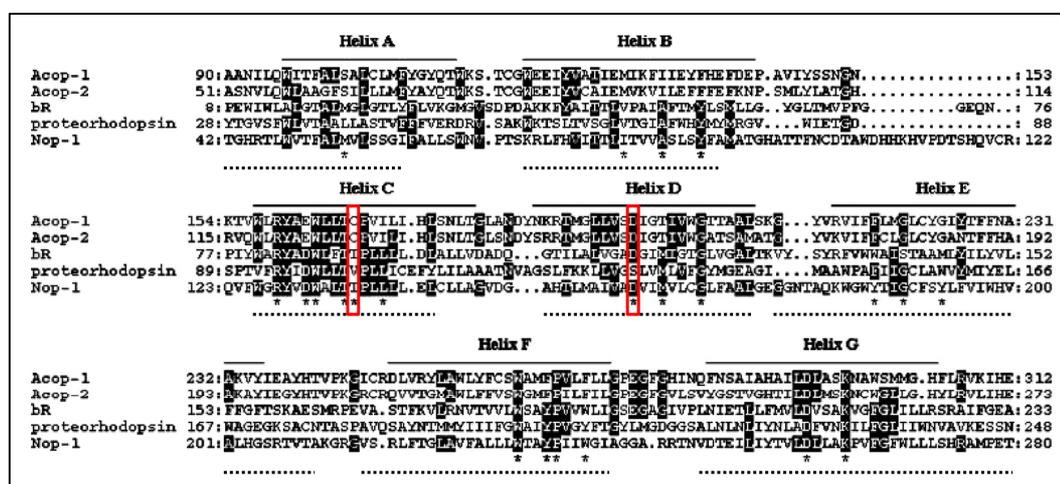
### **2.8.3 Belichtung**

Die Oozyte befand sich in erhöhter Position in der Badlösung damit der Lösungsfluss über die gesamte Zelloberfläche möglich war. Der kontinuierliche Austausch der Badlösung wurde durch ein Perfusionssystem und eine an der Messkammer angebrachte Absaugvorrichtung gewährleistet. Die Belichtung der Oozyte erfolgte je nach Experiment durch Laserlicht verschiedener Wellenlängen (473 nm, 532 nm, 405 nm) das über einen Lichtleiter aus Kunststoff (Querschnittsfläche 1,8 mm<sup>2</sup>) an die Oozyte weitergeleitet wurde. Hierfür wurde der Ausgang der Faser in unmittelbarer Nähe der Zelloberfläche fixiert. Die Belichtungsdauer und -intensität wurde durch einen an der Faser angebrachten Photosensor aufgezeichnet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Elektrophysiologische Untersuchung von ChR2-Mutanten

Da zu Beginn dieser Arbeit keine Kristallstruktur vorlag, wurden für die Auswahl geeigneter Mutationsstellen Sequenzvergleiche mit BR, ChR1 und ChR2 durchgeführt (Abb. 3.1).



**Abb. 3.1:** Sequenzvergleich von ChR1 (Acop-1) und ChR2 (Acop-2) aus *Chlamydomonas reinhardtii*, BR aus *Halobacterium salinarum*, Proteorhodopsin eines bisher nicht kultivierten Eubakteriums und Nop-1 aus *Neurospora crassa*. Transmembranelices und mit dem Chromophor (Retinal) in Kontakt stehende Reste in der Kristallstruktur von Bakteriorhodopsin sind mit durchgehenden Linien und Sternen (\*) markiert. Mit einer unterbrochenen Linie unterstrichene Bereiche markieren die Transmembranelices in einem kristallisierten ChR1/ChR2-Chimärenprotein (Kato *et al.*, 2012). Die in dieser Arbeit untersuchten Aminosäuren C128, D156 in ChR2 bzw. C167, D195 in ChR1 sind rot umrahmt. Modifiziert nach Suzuki *et al.* (2003).

Besondere Bedeutung für die nachfolgenden Untersuchungen nahm die dritte der insgesamt sieben Helices ein, da hier der Konservierungsgrad mit 60 % Sequenzidentität in ChR1 und ChR2 am höchsten ist. Eine Beteiligung an strukturbestimmenden und funktionellen Prozessen, beispielsweise der Schaltung von leitenden in nichtleitende Zustände erschien daher wahrscheinlich. Zusätzlich weist dieser Bereich in Bakteriorhodopsin die größte Zahl an Kontaktstellen zum Chromophor auf. Unterschiede

in der Aminosäureabfolge in diesem Bereich könnten daher verantwortlich für Abweichungen bei maximaler Anregungswellenlänge, Kinetik und Photozyklus zwischen Channelrhodopsinen und Bakteriorhodopsin sein.

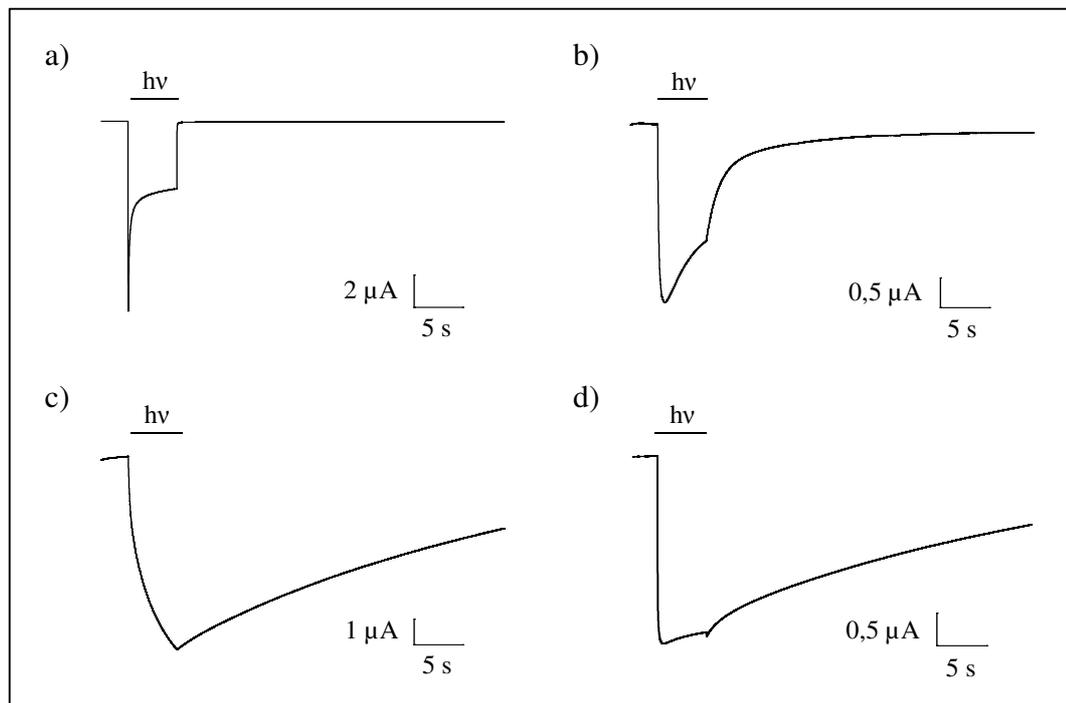
### 3.1.1 Mutation von C128 und D156

Luecke *et al.* (2001) und Patzelt *et al.* (2002) zeigten, dass in Bakteriorhodopsin ein Threoninrest (T90) in unmittelbarer Nähe der C<sub>11</sub>/C<sub>12</sub> Kohlenstoffatome des Chromophors liegt und eine Wasserstoffbrückenbindung mit einem Aspartatrest (D115) ausbildet. Mutationen dieser Aminosäuren resultierten in einer geringeren Stabilität des Proteins, einer Verlangsamung des Photozyklus und einer Anhäufung der M-, N- und O-Photozyklusintermediate (Peralvarez *et al.*, 2001; Lanyi *et al.*, 2003). Aufgrund dessen wurden die entsprechenden Aminosäuren C128 und D156 in ChR2 ausgewählt und folgende Mutanten hergestellt: ChR2-C128T, ChR2-C128A und ChR2-D156A. Analog zu den Befunden in Bakteriorhodopsin, wurde der Einfluss dieser Reste auf Stabilität, Funktion und Kinetik des Kanals untersucht.

### 3.1.2 Schließzeiten

Zur Bestimmung der Kinetik der ChR2-Mutanten wurde mittels *in vitro*-Translation synthetisierte RNA in Oozyten von *X. laevis* injiziert und diese für 72 h in einer mit all-*trans*-Retinal versetzten Ringerlösung (10 µM) bei 16 °C inkubiert. Anschließend wurden die lichtinduzierten Ströme mittels elektrischer Messungen (s. 2.8.1) nach Anregung mit 473 nm für 5 s aufgezeichnet.

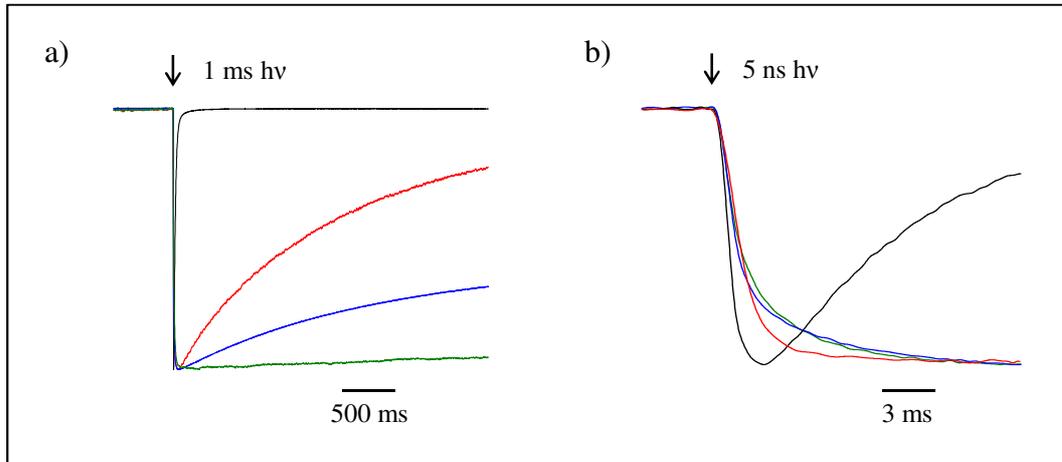
In Abb. 3.2 erkennt man, dass der Austausch des Cysteins an Position 128 bzw. Aspartats an Position 156 zu einer deutlichen Verlangsamung des Schließvorgangs mit Zeitkonstanten von 1,5 s bei ChR2-C128T, 40 s bei ChR2-C128A und mehr als 100 s bei ChR2-D156A im Gegensatz zum ChR2-WT mit 15 ms führte (siehe Tab. 3.1).



**Abb. 3.2:** Elektrische Messung lichtinduzierter Ströme von ChR2-WT und -Mutanten in Oozyten von *X. laevis*. (a) Photostrom von ChR2-WT bei einer Belichtung für 5 s. (b) Photostrom von ChR2-C128T bei einer Belichtung für 5 s. (c) Photostrom von ChR2-C128A bei einer Belichtung für 5 s. (d) Photostrom von ChR2-D156A bei einer Belichtung für 5 s. Die Messungen wurden in einer Ringer-Lösung mit einem pH-Wert von 7,6 bei einer Klemmspannung von -100 mV aufgezeichnet. Die Belichtung (hv) erfolgte durch einen Dioden-gepumpten Festkörperlaser der Wellenlänge 473 nm mit einer Intensität von  $8 \text{ mW/mm}^2$  ( $\approx 2 \times 10^{18} \text{ Photonen cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ).

### 3.1.3 Öffnungszeiten

Um zu testen, ob auch andere kinetische Parameter betroffen waren, wurden ChR2-WT, -C128T, -C128A und -D156A exprimierende Oozyten mit kurzen Laserpulsen für 1 ms (a) bzw. 5 ns (b) angeregt. Da sehr schnelle Abläufe, wie z.B. das Öffnen des Kanals, aufgezeichnet werden sollten, wurde die Aufnahmezeit hierbei von 1 kHz auf 10 kHz erhöht.



**Abb. 3.3:** Elektrische Messung der Photoströme nach Belichtung mit kurzen Laserpulsen. (a) Überlagerung der normierten Stromspuren von ChR2-WT (schwarz), -128T (rot), -128A (blau) und -D156A (grün) exprimierenden Oozyten nach einer Belichtung für 1 ms. (b) Überlagerung der normierten Stromspuren von ChR2-WT (schwarz), -C128T (rot), -C128A (blau) und -D156A (grün) exprimierenden Oozyten nach einer Belichtung für 5ns. Die Messungen wurden in einer Ringer-Lösung mit einem pH -Wert von 7,6 bei einer Klemmspannung von -100 mV aufgezeichnet. Die Belichtung (hv) erfolgte in (a) mittels eines Dioden-gepumpten Festkörperlaser mit einer Wellenlänge von 473 nm bzw. in (b) mittels eines Nd:YAG Puls lasers.

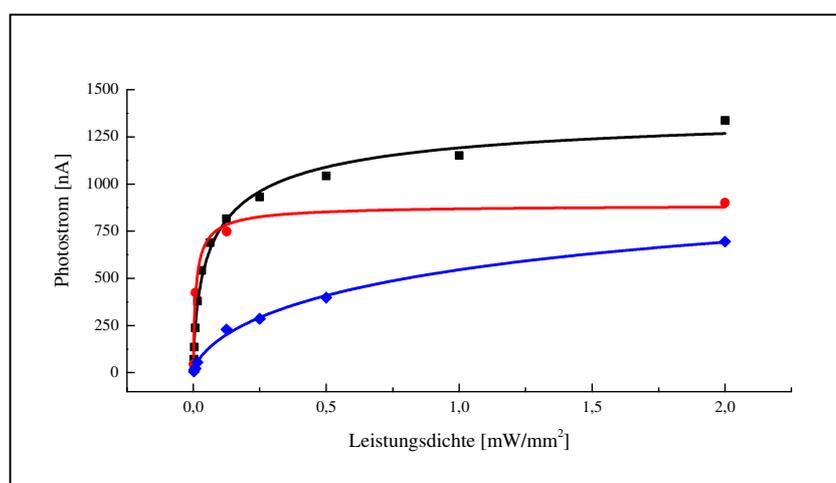
Abb. 3.3 zeigt, dass auch der Öffnungsvorgang der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp bis zu 25fach verzögert ablief (siehe Tab. 3.1). Somit konnte gezeigt werden, dass der verlangsamende Effekt dieser Mutationen nicht nur auf den Schließvorgang beschränkt war, sondern den Ablauf des gesamten Photozyklus beeinflusste.

**Tab. 3.1:** Auflistung der kinetischen Parameter von ChR2-WT, -C128T, -C128A und -D156A bei -100 mV in Ringerlösung mit pH 7,6. Die Öffnungszeit von ChR2-WT konnte zeitlich nicht aufgelöst werden, der Wert wurde aus Nagel *et al.* (2003) übernommen.

Variante	$\tau_{\text{on}}$	$\tau_{1\text{off}}$	$\tau_{2\text{off}}$
ChR2-WT	0,2 ms	0,01 s	-
ChR2-C128T	$6 \pm 1$ ms	$1 \pm 0,1$ s	$7 \pm 0,4$ s
ChR2-C128A	$8 \pm 3$ ms	$40 \pm 13$ s	-
ChR2-D156A	$5 \pm 0,1$ ms	>100 s	-

### 3.1.4 Lichtabhängigkeit

Um zu untersuchen, ob die verlängerte Lebensdauer des offenen Zustandes einen Einfluss auf die Lichtsensitivität hatte, wurden die Halblichtsättigungswerte von Wildtyp und mutierten Channelrhodopsine bestimmt. Hierfür wurden ChR2 exprimierende Oozyten für 10 s mit ansteigender Lichtintensität angeregt (473 nm) und die Amplitude des Photostroms nach Erreichen des stationären Stromes bestimmt (Abb. 3.4).



**Abb. 3.4:** Bestimmung der Lichtsensitivität von ChR2-WT (blau), ChR2-C128T (schwarz) und ChR2-C128A (rot) in Oozyten bei unterschiedlichen Intensitäten (473 nm;  $1 \text{ mW/mm}^2 \approx 2,4 \times 10^{17} \text{ cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). Die Messungen wurden in einer Ringer-Lösung mit einem pH-Wert von 7,6 bei einer Klemmspannung von -100 mV durchgeführt, Stromamplituden wurden nach Erreichen des stationären Stroms (ca. 20 s nach Belichtung) abgelesen.

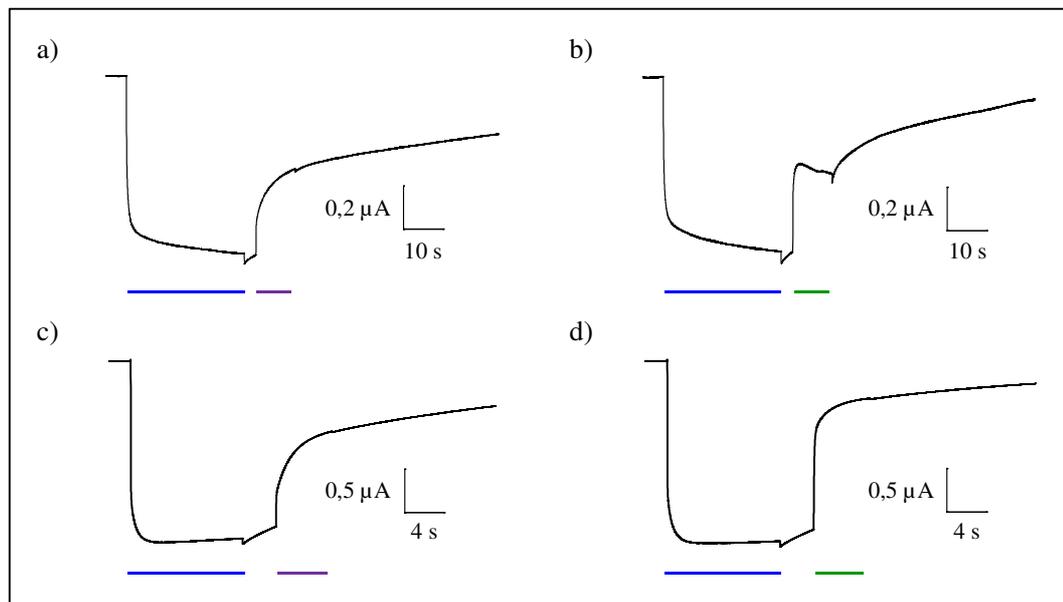
Die Halblichtsättigungswerte nahmen von  $0,7 \text{ mW/mm}^2$  beim Wildtyp über  $0,08 \text{ mW/mm}^2$  bei ChR2-C128T bis  $0,01 \text{ mW/mm}^2$  bei ChR2-C128A und -D156A ab. Es bestand daher eine Korrelation zwischen Verlangsamung der Schließzeit und erhöhter Lichtsensitivität.

**Tab. 3.2:** Gegenüberstellung der Halblichtsättigungswerte und Schließzeiten von ChR2-WT, -C128T, -C128A und -D156A bei -100 mV in Ringerlösung mit pH 7,6.

Variante	$I_{0,5}$ ( mW/mm <sup>2</sup> )	$\tau_{1_{\text{off}}}$	$\tau_{2_{\text{off}}}$
ChR2-WT	0,7	0,01 s	-
ChR2-C128T	0,08	$1 \pm 0,1$ s	$6,5 \pm 0,4$ s
ChR2-C128A	0,01	$40 \pm 13$ s	-
ChR2-D156A	0,01	>100 s	-

### 3.1.5 Beschleunigtes Schließen

Spektroskopische Untersuchungen an der Wildtypform des ChR2-Kanals zeigten die Beteiligung von Photointermediaten mit einer Absorption bei 390 nm (P390) und 520 nm (P520) am Photozyklus (Bamann *et al.*, 2008). Um die Auswirkung dieser Wellenlängen bei ChR2-C128A und -D156A zu testen, wurden injizierte Oozyten mit blauem Licht (473 nm) angeregt und nach 2-sekündiger Pause mit grünem (532 nm) bzw. violetterem (405 nm) Laserlicht belichtet.



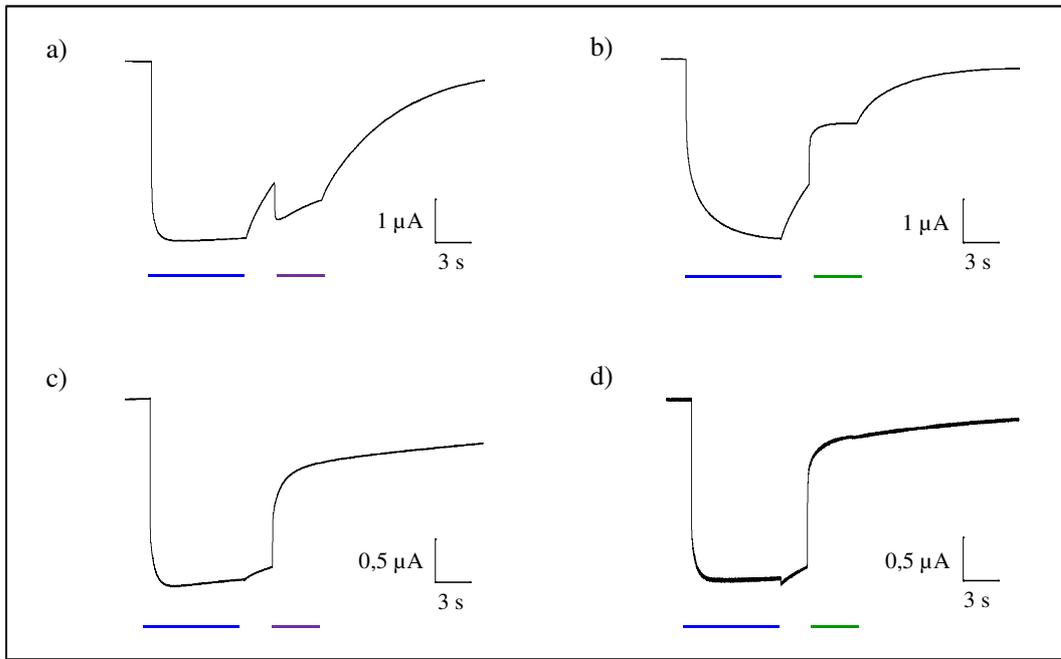
**Abb. 3.5:** Inhibition von ChR2-C128A und -D156A bei Belichtung mit grünem und violetterm Licht. (a) Photostrom von ChR2-C128A bei 10 s violetterm Licht nach 40 s Blaulichtaktivierung. (b) Photostrom von ChR2-C128A bei 10 s grünem Licht nach 40 s Blaulichtaktivierung. (c) Photostrom von ChR2-D156A bei 5 s violetterm Licht nach 10 s Blaulichtaktivierung. (d) Photostrom von ChR2-D156A bei 5 s grünem Licht nach 10 s Blaulichtaktivierung. Die Messungen wurden in einer Ringer-Lösung mit einem pH -Wert von 7,6 bei einer Klemmspannung von -100 mV aufgezeichnet. Die Belichtungsdauer und Lichtqualitäten sind durch die farbigen Balken gekennzeichnet. Folgende Dioden-gepumpte Festkörperlaser kamen zum Einsatz: Blaulicht (473 nm) 8 mW/mm<sup>2</sup>, Grünlicht (532 nm) 20 mW/mm<sup>2</sup>, violettes Licht (405 nm), 5 mW/mm<sup>2</sup>.

In Abb. 3.5 erkennt man, dass die Belichtung mit Licht der Wellenlängen 532 nm und 405 nm in beiden ChR2-Mutanten zu einer Beschleunigung des Schließvorgangs führte. Dieses Ergebnis war ein Indiz dafür, dass auch in den Photozyklen von ChR2-C128A und -D156A die Photointermediate P390 und P520 beteiligt waren.

### 3.1.6 pH-Abhängigkeit

Bamann *et al.* (2010) und Berndt *et al.* (2010) wiesen eine schnelle (25  $\mu$ s), reversible und protonenabhängige Umwandlung des P390 in das P520 Intermediat im Photozyklus von ChR2-C128A nach. Um diesen Effekt elektrophysiologisch zu untersuchen, wurden ChR2-C128A exprimierende Oozyten in Ringerlösungen mit unterschiedlichen pH-Werten

(4 und 9), nach einer 10-sekündigen Anregung bei 473 nm mit grünem oder violetterm Laserlicht für 5 s belichtet und die Photoströme aufgezeichnet.

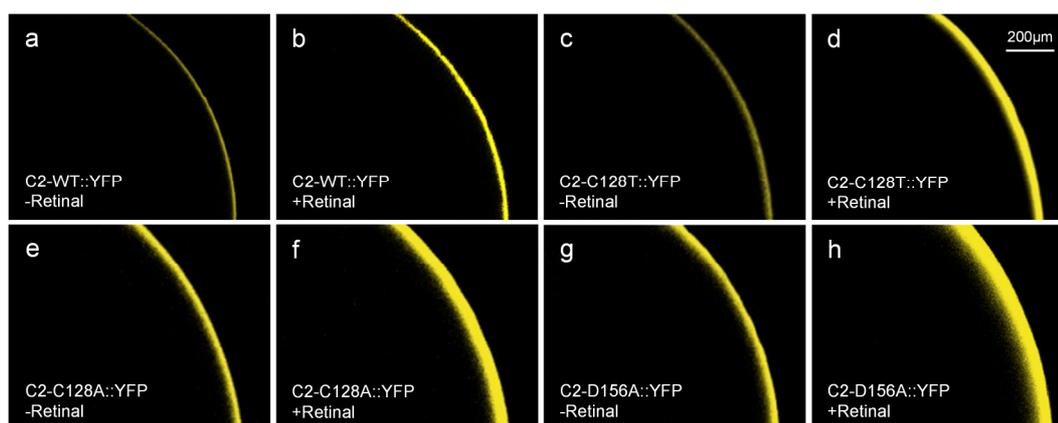


**Abb. 3.6:** Inhibition und Aktivierung von ChR2-C128A mit grünem und violetterm Licht. (a) Aktivierung von ChR2-C128A bei pH 4 durch violettes Licht für 5 s nach 10 s Blaulicht. (b) Inhibition von ChR2-C128A bei pH 4 durch Grünlicht für 5 s nach 10 s Blaulicht. (c) Inhibition von ChR2-C128A bei pH 9 durch violettes Licht für 5 s nach 10 s Blaulicht. (d) Inhibition von ChR2-C128A bei pH 9 durch Grünlicht für 5 s nach 10 s Blaulicht. Die Messungen wurden in einer Ringer-Lösung bei einer Spannung von -100 mV aufgezeichnet. Die Belichtungsdauer und Lichtqualitäten sind durch die farbigen Balken gekennzeichnet. Folgende Dioden-gepumpte Festkörperlaser kamen zum Einsatz: Blaulicht (473nm) 8 mW/mm<sup>2</sup>, Grünlicht (532 nm) 20 mW/mm<sup>2</sup>, violettes Licht (405 nm), 5 mW/mm<sup>2</sup>.

In Abb. 3.6 erkennt man, dass bei pH 9 eine violette Belichtung (405nm) zu einer Inhibition des Kanals auf etwa 50 % des Maximalwertes führte. Im Gegensatz dazu hatte bei pH 4 eine Belichtung mit 405 nm eine etwa 80 %ige Aktivierung zur Folge. Bei grünem Licht (532 nm) hatten Änderungen des externen pH Werts keinen Einfluss auf die Art der Stromantwort. Sowohl bei pH 4 als auch pH 9 trat eine 30 %ige bzw. 50 %ige Inhibition des Kanals auf.

### 3.1.7 Expressionsanalysen mittels CLSM

Für vergleichende Expressionsanalysen von ChR2-Wildtyp, -C128T, -C128A und -D156A wurde ein fluoreszenzmikroskopischer Ansatz verwendet. Die Fusion einer gelb fluoreszierenden Variante (YFP) des grün fluoreszierenden Proteins GFP (green fluorescent protein), aus *Aequorea victoria*, an den C-Terminus der Channelrhodopsine ermöglichte sowohl Lokalisation als auch Quantifizierung der Expressionsprodukte über die Intensität des emittierten Lichtsignals. In Oozyten aus *X. laevis* wurde RNA folgender Proteine injiziert: ChR2-WT::YFP, ChR2-C128T::YFP, ChR2-C128A::YFP und ChR2-D156A::YFP. Nach 3-tägiger Inkubation wurden die Oozyten an einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop auf ihre Fluoreszenz hin untersucht und deren Intensität verglichen.



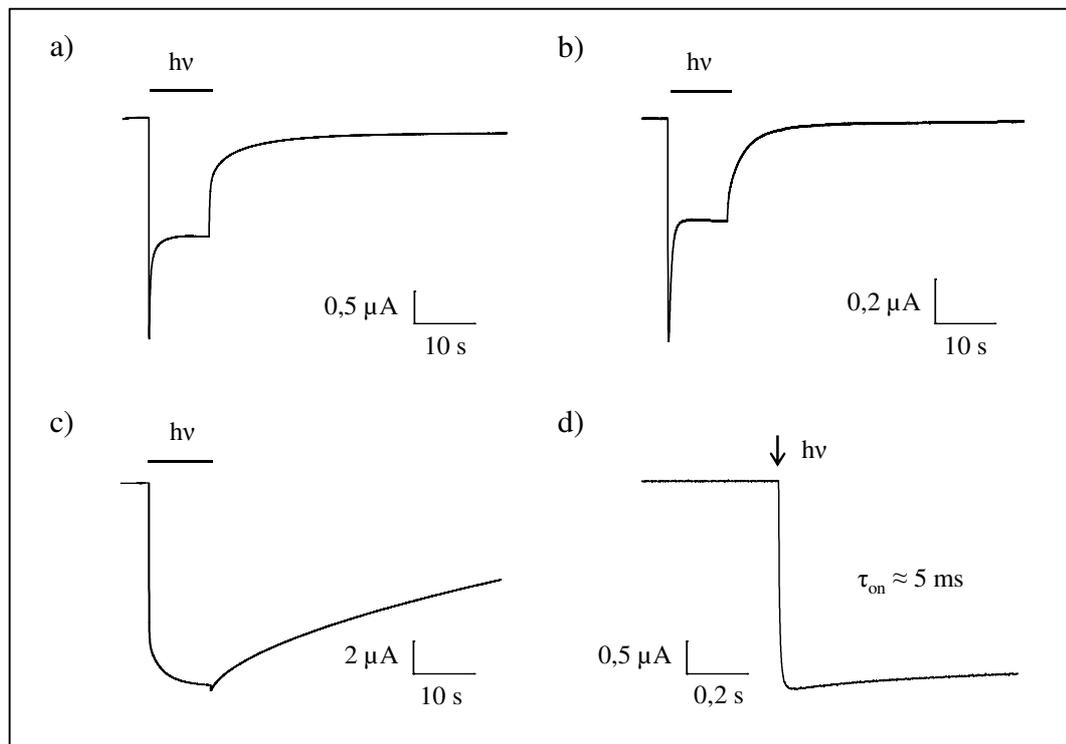
**Abb. 3.7:** Fluoreszenz von ChR2-YFP Wildtyp und -Mutanten in Abhängigkeit von Retinal. Oozyten von *X. laevis* wurden nach Injektion von 20 ng *in vitro* synthetisierter RNA für 72 h bei 16 °C in Ringerlösung mit und ohne Retinalzugabe (10 μM) inkubiert. (a, b) Expression von ChR2-WT::YFP ohne und mit Retinal. (c, d) Expression von ChR2-C128T ohne und mit Retinal. (e, f) Expression von ChR2-C128A ohne und mit Retinal. (g, h) Expression von ChR2-D156A::YFP ohne und mit Retinal. Optische Schnitte wurden an einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop mit einer Anregung mit 514 nm angefertigt.

Abb. 3.7 zeigt, dass bei Oozyten, in die RNA eines ChR2-YFP-Fusionskonstrukts injiziert wurde, ein an der Plasmamembran lokalisiertes YFP-Signal auftrat. Im Vergleich zum Wildtyp war die Expression der Mutanten deutlich erhöht, das stärkste Fluoreszenzsignal trat bei ChR2-C128A und -D156A mit einer etwa 3fach höheren Intensität auf.

Zusätzlich zeigten sich große Unterschiede bei der Proteinmenge in Abhängigkeit der Retinalkonzentration im umgebenden Medium während der Inkubation. Eine Zugabe von Retinal nach der Injektion führte bei allen ChR2-Varianten zu einem Anstieg der YFP-Signalintensität. Wurde kein Retinal zugesetzt, war die Menge exprimierten Proteins bei ChR2-C128A und -D156A um ein Vielfaches höher als beim Wildtyp

### **3.1.8 Ko-Mutation von C128 und D156**

Wie in 3.1.2 gezeigt, führten sowohl Mutationen des Cysteins an Position 128 als auch des Aspartats an Position 156 zu einer vergleichbaren, verlangsamten Kinetik. Spektroskopische und elektrophysiologische Analysen an diesen Mutanten von Bamann *et al.* (2010) wiesen auf eine Wasserstoffbrücke zwischen diesen Aminosäuren hin, die einen richtenden Einfluss auf den Schließvorgang und andere kinetische Parameter haben könnte. Durch die Analyse weiterer ChR2-Varianten sollte dies genauer untersucht werden. Mittels zielgerichteter Mutagenese wurden die folgenden ChR2-Mutanten hergestellt: ChR2-C128D, -D156C und -C128D/D156C. Diese wurden analog zu 3.1.2 und 3.1.7 elektrophysiologisch und fluoreszenzmikroskopisch charakterisiert.



**Abb. 3.8:** Elektrische Messung lichtinduzierter Ströme von ChR2-C128D, -D156C und -C128D/D156C in Oozyten von *X. laevis*. (a) Photostrom von ChR2-C128D bei einer Belichtung für 10 s. (b) Photostrom von ChR2-C128D/D156C bei einer Belichtung für 10 s. (c) Photostrom von ChR2-D156C bei einer Belichtung für 10 s. (d) Photostrom und Öffnungszeit von ChR2-D156C bei einer Belichtung mit kurzen Laserlichtpulsen (5 ns, 473 nm). Die Messungen wurden in einer Ringer-Lösung mit pH 7,6 bei einer Spannung von -100 mV durchgeführt. Die Belichtung (hv) erfolgte in (a-c) durch einen Dioden-gepumpten Festkörperlaser mit 473 nm bzw. in (d) durch einen Nd:YAG Puls laser bei 473 nm.

In Abb. 3.8 erkennt man, dass sowohl ChR2-C128D als auch -C128D/D156C nach einer 10sekündigen Anregung mit zwei Zeitkonstanten ( $\tau_{1off}$  und  $\tau_{2off}$ ) schlossen. Diese betragen bei ChR2-C128D 0,5 s und 7,5 s; bei ChR2-C128D/D156C 1 s und 5 s (Tab. 3.3). Im Vergleich zu ChR2-WT hatten Oozyten die ChR2-D156C exprimierten, bis zu 10x höhere Photoströme; der maximal gemessene Strombetrag bei einer Spannung von -100 mV betrug 60 μA. Die Schließzeit dieser Mutante konnte aufgrund des ungewöhnlich hohen Photostroms nur annähernd auf einen Wert von über 100 s bestimmt werden. Ein beschleunigtes Schließen mit Licht anderer Wellenlänge wie bei ChR2-D156A (Abb. 3.5) trat nicht auf.

**Tab. 3.3:** Zusammenstellung der Schließzeiten von ChR2-C128D, -D156C und -C128D/D156C in Ringer-Lösung mit pH 7,6 bei einer Spannung von -100 mV

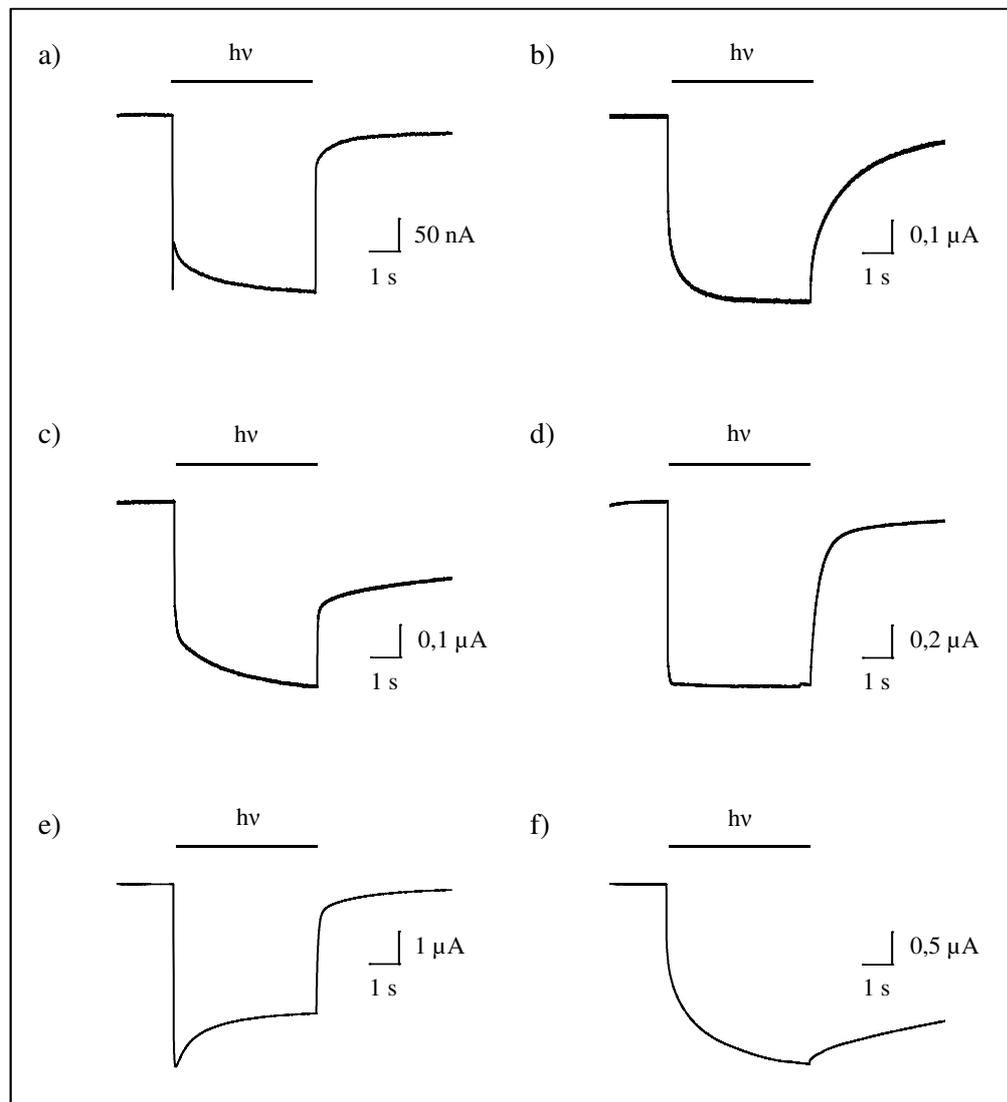
Variante	$\tau_{1\text{off}}$	$\tau_{2\text{off}}$
ChR2-C128D	$5 \pm 0,7$ s	$1 \pm 0,2$ s
ChR2-D156C	>100 s	-
ChR2-C128D/D156C	$7,5 \pm 0,2$ s	$0,5 \pm 0,1$ s

## 3.2 Elektrophysiologische Untersuchung von ChR1- Mutanten

### 3.2.1 Mutation von C167 und D195

Wegen der hohen Konservierung der 3. und 4. Helix in ChR1 und ChR2, sollten die Auswirkungen von Mutationen der korrespondierenden Aminosäuren zu ChR2-C128 und -D156 in ChR1 getestet werden. Mittels zielgerichteter Mutagenese wurden ChR1-D195C, -D195A, -C167T, -C167A und die Doppelmutante ChR1-C167T/D195C hergestellt und nach Expression in Oozyten elektrophysiologisch und fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

Abb. 3.9 zeigt die Stromantworten bei Belichtung von ChR1 exprimierenden Oozyten mit 6 s Blaulicht. Die Wildtyp-Form des ChR1 zeigt den typischen Stromverlauf mit einem Peakstrom von ca. 250 nA und anschließendem Plateaustrom von 200 nA. ChR1-C167T, -C167A und D195A weisen einen bis zu 5fach höheren stationären Photostrom auf; die maximalen Stromamplituden betragen zwischen 0,5 und 1  $\mu$ A. Diese Zunahme war von einer verlangsamten Kinetik des Kanals begleitet, mit Schließzeiten zwischen 8 ms bei ChR1-D195A und 1,2 s bei ChR1-C167T.



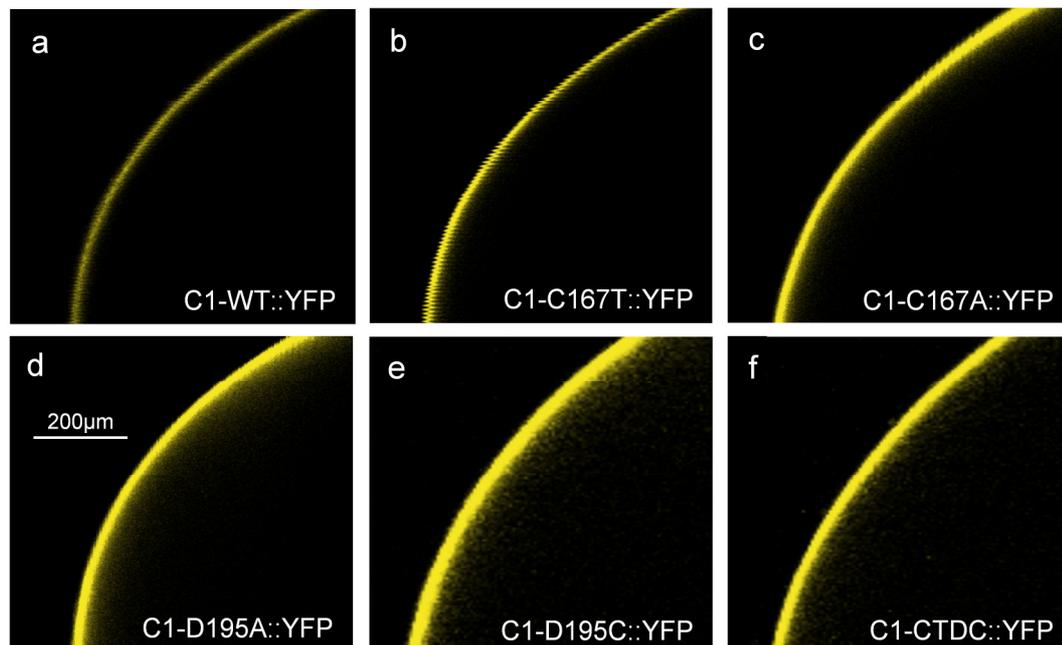
**Abb. 3.9:** Elektrische Messung lichtinduzierter Ströme von ChR1-WT und -Mutanten. (a) Photostrom von ChR1-WT bei einer Belichtung für 5 s. (b) Photostrom von ChR1-C167T bei einer Belichtung für 5 s. (c) Photostrom von ChR1-C167A bei einer Belichtung für 5 s. (d) Photostrom von ChR1-D195A bei einer Belichtung für 5 s. (e) Photostrom von ChR1-D195C bei einer Belichtung für 5 s. (f) Photostrom von ChR1-C167T/D195C bei einer Belichtung für 5 s. Die Messungen wurden in einer Ringer-Lösung mit pH 7,6 bei einer Spannung von -100 mV durchgeführt. Die Belichtung (hv) erfolgte durch einen Dioden-gepumpten Festkörperlaser (473 nm) mit einer Intensität von 8 mW/mm<sup>2</sup>.

Bei ChR1-D195C exprimierenden Oozyten stieg der maximale Strombetrag bei einer Spannung von -100 mV auf 5  $\mu$ A an. Wie schon bei ChR2-D156C (3.1.8), entsprach dies einer 20fachen Erhöhung im Vergleich zur Wildtypform. Im Gegensatz zu 100 s bei

ChR2-D156C stieg die Schließzeit nur auf einen Wert von 50 ms an. Ein stark verlangsamtes Schließen analog zu ChR2-C128A und -D156A trat nur bei der Doppelmutante ChR1-D195C/C167T auf, die Schließzeit stieg hier auf 24 s an. Der maximale Photostrom betrug 2,5  $\mu$ A, was etwa dem 10fachen Strombetrag der Wildtypform von ChR1 entsprach. Die Mutationen dieser Aminosäuren in ChR1 hatten somit ähnliche Auswirkungen auf Stromhöhe und -verlauf wie in ChR2.

### **3.2.2 Expressionsanalysen mittels CLSM**

Die Ähnlichkeiten des Stromverlaufs zwischen ChR2-C128 und ChR1-C167 bzw. ChR2-D156 und -D195 Mutanten legen nahe, dass in ChR1 ebenfalls eine Interaktion dieser Aminosäuren, möglicherweise über eine Wasserstoffbrücke, für den korrekten Ablauf des Photozyklus notwendig ist. Um zu untersuchen, ob analog zu 3.1.7 bei ChR1-C167T und -D195C Expressionsunterschiede zwischen Wildtyp- und mutiertem Protein bestehen, wurden C-terminal gekoppelte YFP-Fusionskonstrukte erstellt, in Oozyten exprimiert und fluoreszenzmikroskopisch untersucht.



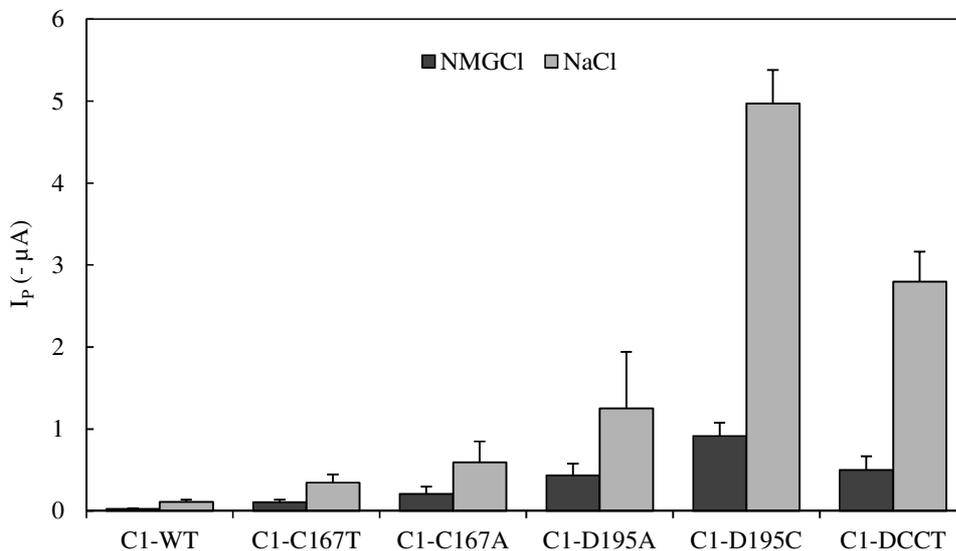
**Abb. 3.10:** Fluoreszenz von ChR1-WT::YFP und Mutanten in Oozyten von *X. laevis*. Es wurden jeweils 20 ng (a) ChR1-WT::YFP, (b) ChR1-C167T::YFP, (c) ChR1-C167A::YFP, (d) ChR1-D195A::YFP, (e) ChR1-D195C::YFP und (f) ChR2-C167T/D195C::YFP RNA injiziert und für 72 h bei 16 °C in Ringerlösung mit Retinal (10 μM) inkubiert. Optische Schnitte wurden an einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop bei einer Anregung mit 514 nm angefertigt.

Abb. 3.10 zeigt, dass bei allen Fusionskonstrukten ein spezifisches, an der Plasmamembran lokalisiertes Signal, mit unterschiedlicher Intensität auftrat. Während die Signalstärke bei der Wildtypform am niedrigsten war, zeigte ChR1-D195C die höchste Fluoreszenz. Dieses Ergebnis deckte sich mit den Photostromstärken in den, in 3.2.1 beschriebenen, elektrischen Messungen. Es bestand daher ein direkter Zusammenhang zwischen Fluoreszenzintensität, Menge an exprimiertem Protein und Stromamplitude.

### 3.2.3 Kationenselektivität

Nagel *et al.* (2002) beschrieben ChR1 als einen lichtaktivierbaren Kanal mit erhöhter Protonenleitfähigkeit und einer maximalen Anregungswellenlänge von 500 nm. Um zu überprüfen, ob die eingeführten Mutationen einen Einfluss auf die Ionenselektivität hatten, wurden 20 ng ChR1-WT, -C167T, -C167A, -D195C, -D195A und -D195C/C167T RNA in Oozyten injiziert und die Photoströme bei Belichtung mit 473 nm Laserlicht aufgezeichnet.

Zur Bestimmung des Verhältnis von reinem Protonen- zu Kationeneinstrom wurden Messungen in einer Ringerlösung mit pH 7,6 und einer Lösung in der Natrium durch N-Methyl-D-glucamin (NMG) ersetzt wurde durchgeführt.  $\text{NMG}^+$  ist ein monovalentes Kation mit einer vergleichbaren osmotischen Aktivität wie Natrium- oder Kaliumionen, kann den Kanal aber aufgrund seiner Größe nicht passieren. Es leistete daher keinen Beitrag zum Photostrom; dieser kam ausschließlich durch den Einstrom von Protonen zustande.



**Abb. 3.11:** Photoströme von ChR1-WT, -C167T, -C167A, -D195C, -D195A und -D195C/C167T in Oozyten von *X. laevis*. Abgelesen wurde die Amplitude des stationären Stroms bei -100 mV in einer Ringerlösung (NaCl) mit pH 7,6 und einer Lösung, in der Natrium durch NMG substituiert wurde (NMGCl, pH 7,6). Die Anregung erfolgte mit blauem Laserlicht (473 nm, 8 mW/mm<sup>2</sup>, 10 s). Dargestellt ist das arithmetische Mittel  $\pm$  Standardfehler, n=5

Wie in Abb. 3.11 erkennbar zeigt die ChR1-D195C Mutante, den höchsten Protoneneinstrom mit bis zu 1  $\mu\text{A}$ , der Wildtyp hingegen nur 50 nA. Für die Bestimmung des Protonenstromanteils am Gesamtstrom wurde der Quotient aus Kationenstrom ( $I_{\text{Na}}$ ) und Protonenstrom ( $I_{\text{NMG}}$ ) berechnet und die erhaltenen Werte verglichen.

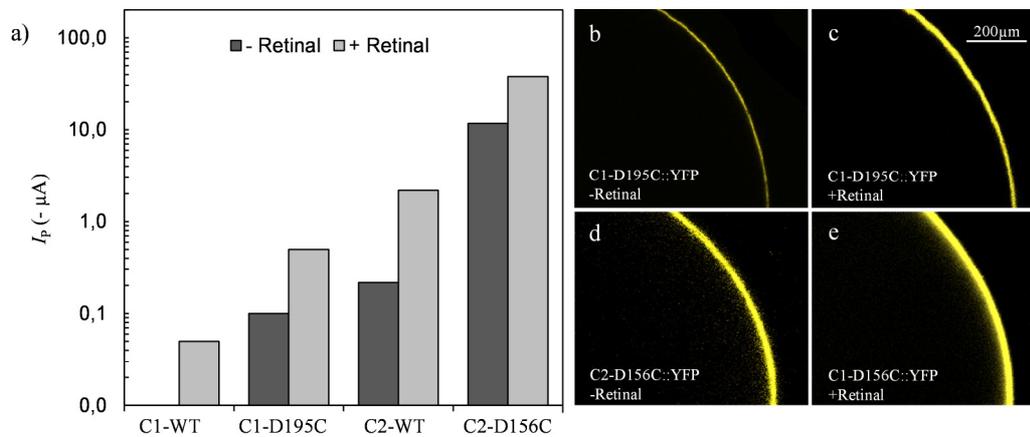
**Tab. 3.4:** Gegenüberstellung der Schließzeiten von ChR1-WT und -Mutanten und den  $I_{\text{NMG}}/I_{\text{Na}}$  Quotienten in %.

Variante	$\tau_{\text{off}}$	$I_{\text{NMG}}/I_{\text{Na}}$ (%)
ChR1-WT	$4,5 \pm 0,3$ ms	23
ChR2-WT	$8 \pm 3$ ms	6
ChR1-C167T	$1,2 \pm 0,1$ s	30
ChR1-C167A	$10 \pm 0,5$ ms	35
ChR1-D195A	$350 \pm 23$ ms	35
ChR1-D195C	$50 \pm 4$ ms	18
ChR1-DCCT	$24 \pm 1$ s	18

Aus Tab. 3.4 kann man entnehmen, dass der Anteil des Protonenstroms am Gesamtstrom von ChR1-WT mit 23 % um das Vierfache höher war als der des ChR2-Wildtyps mit 6 %. Die Protonenleitfähigkeit der ChR1-C167T, -C167A und -D195A Mutanten war mit einem  $I_{\text{NMG}}/I_{\text{Na}}$ -Quotient von 30-35 % im Vergleich zum ChR1-WT deutlich erhöht. Der Protonenstromanteil der ChR1-D195C und -D195C/C167T Mutanten unterschied sich mit 18 % kaum vom Wildtyp. Es konnte also nicht nur bestätigt werden, dass ChR1 eine höhere Protonenleitfähigkeit als ChR2 aufweist, sondern auch, dass diese, durch die oben aufgeführten Mutationen noch deutlich gesteigert werden kann.

### 3.2.4 Retinalabhängigkeit

Aufgrund der stark erhöhten Leitfähigkeiten von ChR1-D195C und ChR2-D156C sollte analog zu 3.1.7 die Abhängigkeit der Proteinmenge vom Retinalgehalt des Inkubationsmediums bestimmt werden. Hierfür wurde ChR1-WT::YFP, ChR1-D195C::YFP, ChR2-WT::YFP und ChR2-D156C::YFP in Oozyten von *X. laevis* exprimiert, für 72 h in einer Ringer-Lösung mit und ohne Retinal (10  $\mu\text{M}$ ) inkubiert und anschließend elektrophysiologisch und fluoreszenzmikroskopisch untersucht.



**Abb. 3.12:** Photoströme und Fluoreszenz von ChR1-WT::YFP, ChR1-D195C::YFP, ChR2-WT::YFP und ChR2-D156C::YFP in Oozyten von *X. laevis*. (a) Elektrische Messungen wurden in einer Ringerlösung mit pH 7,6 bei einer Spannung von -100 mV durchgeführt. Die Anregung erfolgte bei 473 nm durch einen Dioden-gepumpten Festkörper-Laser (8 mW/mm<sup>2</sup>) für 5 s. Photoströme wurden nach Erreichen des stationären Stroms abgelesen (b, c) Expression von ChR1-D195C::YFP ohne und mit Retinal. (d, e) Expression von ChR2-D156C::YFP ohne und mit Retinal. Optische Schnitte wurden an einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop bei einer Anregung mit 514 nm angefertigt.

Wurde ChR1-WT::YFP in Oozyten exprimiert, konnte nur bei Zugabe von 10 µM Retinal im Inkubationsmedium ein Photostrom von 50 nA gemessen werden. Im Gegensatz dazu trat bei Expression von ChR1-D195C::YFP in retinalfreiem Medium ein Strom von 100 nA auf; die Gegenwart von Retinal während der Inkubation führte zu einem 7-fachen Anstieg auf ca. 700 nA. Bei der Expression von ChR2-WT::YFP führte die Zugabe von Retinal während der Inkubation zu einem 10-fachen Anstieg des Photostroms von 200 nA auf 2 µA. In Oozyten die ChR2-D156C::YFP ohne zusätzliches Retinal exprimierten, lag der Photostrom bei ca. 11 µA, was dem 5-fachen der mit Retinal inkubierten ChR2-WT-Zellen entsprach. Nach Retinalzugabe erhöhte sich der lichtinduzierte Strom auf Werte bis zu 50 µA.

Die durchgeführten fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen korrelierten mit den Ergebnissen der elektrophysiologischen Messungen. Wie in Abb. 3.12 zu erkennen ist, war bei Expression von ChR1-D195C::YFP im Gegensatz zu ChR1-WT::YFP auch ohne zusätzliches Retinal ein Fluoreszenzsignal sichtbar, das sich bei Retinalzugabe deutlich

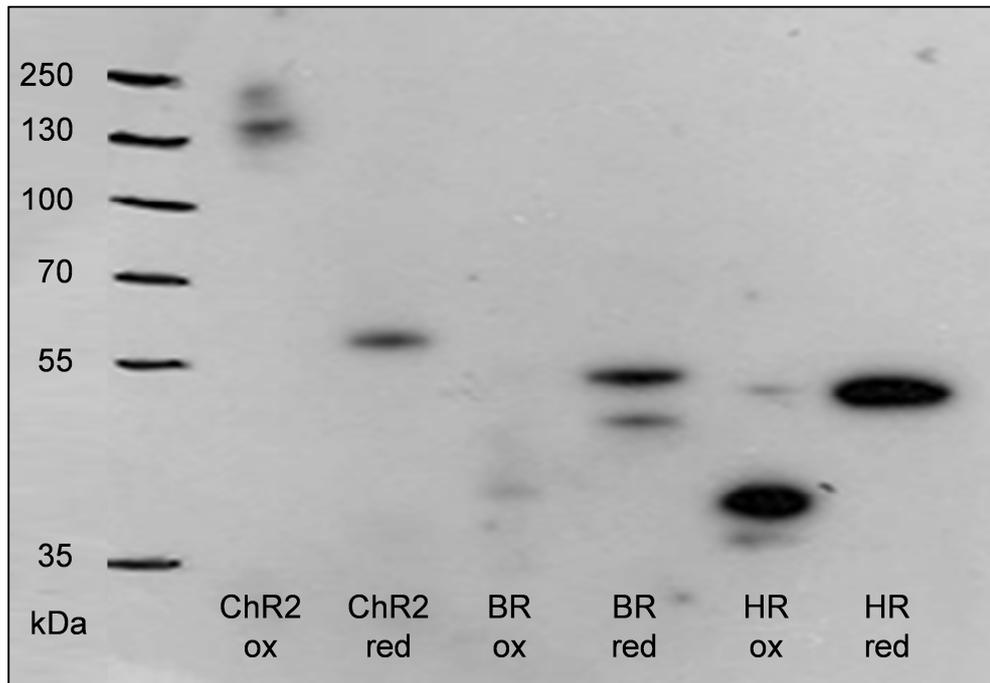
verstärkte. Bei ChR2-WT::YFP und ChR2-D156C::YFP exprimierenden Oozyten trat nach Retinalzugabe ein identischer Effekt auf. Ohne Retinal war die YFP-Fluoreszenz bei ChR2-D156C::YFP sogar stärker als bei ChR2-WT::YFP mit Retinal.

### **3.3 Interaktion und Struktur**

Muller *et al.* (2011) identifizierten anhand Elektronen-Kristallographischer Experimente an heterolog exprimiertem gereinigtem ChR2-Protein eine mögliche dimere Konformation des Ionenkanals *in vivo*. Kato *et al.* (2012) bestätigten dies durch die Kristallstruktur eines Channelrhodopsins mit einer Auflösung von 2,3 Å und lieferten damit erstmals genauere Informationen über die strukturbildenden und funktionellen Bereiche des Proteins, wie etwa Retinalbindetasche, die Kontaktflächen der Protomere oder die Porenregion. Die zuvor in dieser Arbeit durchgeführten biochemischen, elektrophysiologischen und fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen an Wildtyp- und Mutanten-Channelrhodopsinen sollten die Kenntnisse über deren Struktur und Funktionsweise weiter vertiefen.

#### **3.3.1 Immunoblot**

Um die Quartärstruktur und Bindungskräfte der dimer-bildenden Untereinheiten in Channelrhodopsinen biochemisch zu untersuchen, wurden Oozyten von *X. laevis* mit 20 ng RNA von ChR2-WT::YFP, BR-WT::YFP und HR-WT::YFP injiziert, für 3 Tage in retinalhaltiger Ringerlösung inkubiert und die Gesamtmembran-Fraktion isoliert. Um den Einfluss von intermolekularen Disulfid- oder Wasserstoffbrücken bei der Oligomerisierung zu untersuchen, wurde ein Teil der Membran-Fractionen mit einem oxidierenden oder reduzierenden Probenpuffer versetzt und anschließend mittels SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nach der Übertragung auf eine Membran wurden die Proteine mit einem gegen GFP-gerichteten Antikörper immunhistologisch angefärbt und die Laufhöhen der markierten Proteine verglichen.



**Abb. 3.13:** Protein-Immunoblot von ChR2, Bakteriorhodopsin und Halorhodopsin. Aufgetragen wurden 4  $\mu$ l Gesamt Membranfraktionsproben von ChR2-WT::YFP (ChR2), BR-WT::YFP (BR) und HR-WT::YFP (HR), die unter oxidierenden (ox) bzw. reduzierenden (red) Bedingungen aufgearbeitet wurden.

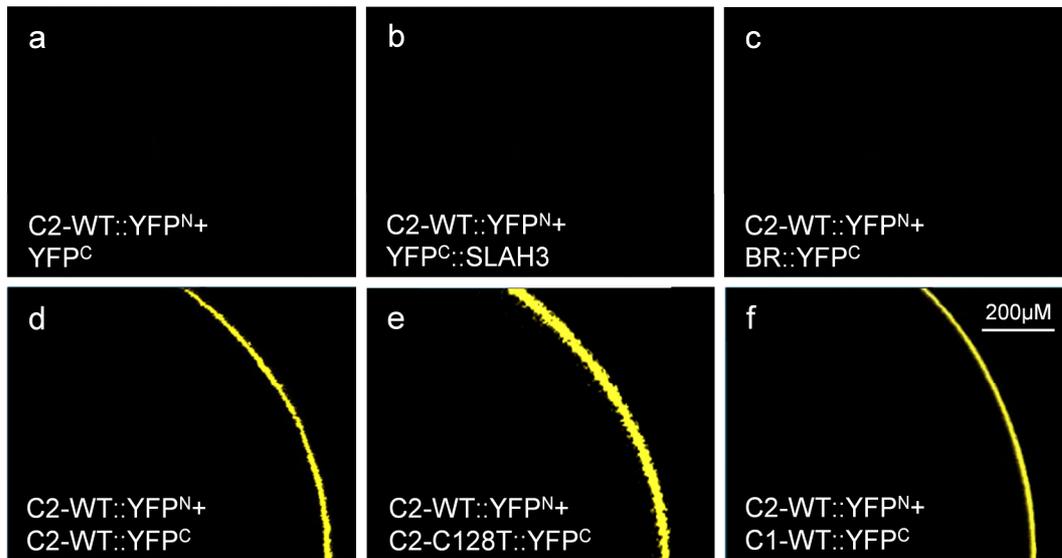
Wie in Abb. 3.13 zu erkennen ist, hatte das in der Gesamtmembran-Fraktion enthaltene ChR2-WT::YFP unter reduzierenden Aufbereitungsbedingungen eine Größe von etwa 60 kDa. Die unter oxidierenden Bedingungen verarbeitete Probe lief auf der doppelten Höhe (ca. 130 kDa). Diese Größen deckten sich mit den berechneten Werten für eine monomere (62 kDa) und dimere (124 kDa) Konformation von ChR2 mit fusioniertem YFP. Analog dazu, liefen die Proben von BR-WT::YFP und HR-WT::YFP unter reduzierenden Bedingungen bei einer Höhe von ca. 50 kDa, was mit den zu erwartenden Größen der Monomer-Untereinheiten von HR-WT::YFP (58 kDa) und BR-WT::YFP (55 kDa) übereinstimmte; unter oxidierenden Bedingungen hingegen mit einer Laufhöhe von etwa 40 kDa noch unter den Monomergrößen.

### 3.3.2 Interaktionsanalysen mittels BIFC

Die Ergebnisse der Immunoblot-Experimente legten nahe, dass ChR2 im nativen, funktionellen Zustand als Dimer vorliegt. Um eine mögliche Interaktion beider

Untereinheiten *in vivo* zu untersuchen, wurde das Verfahren der Bi-molekularen Fluoreszenzkomplementation (BIFC) angewandt. Hierfür wurden mittels der USER-Klonierungstechnik (2.3.10) die für ChR1 bzw. ChR2, und Bakteriorhodopsin kodierende Sequenz mit der für den N- (aa 1-155) oder C-terminalen (aa 156-238) kodierenden Teil eines gesplitteten fluoreszenten YFP-Proteins (Venus) fusioniert. Die durch *in vitro*-Translation synthetisierte RNA wurde in verschiedenen Kombinationen in Oozyten injiziert. Nach dreitägiger Inkubation in retinalhaltiger Ringerlösung wurden diese mit einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop auf YFP-Fluoreszenzsignale hin getestet. Diese konnte nur bei einer Interaktion der, an die YFP-Fragmente gekoppelten Proteine auftreten

Um auszuschließen, dass Wechselwirkungen zwischen den YFP-Untereinheiten für eine Fluoreszenzkomplementation ausreichen, wurde RNA von ChR2-WT::YFP<sup>N</sup> mit der des C-terminalen Teil des YFP-Proteins ohne fusionierten Interaktionspartner in Oozyten injiziert. In Abb. 3.14 erkennt man, dass kein Fluoreszenzsignal auftrat. Zusätzlich sollte ausgeschlossen werden, dass eine Aggregation membranärer Proteine zu einer Fluoreszenz führte. Hierfür wurde YFP<sup>C</sup>::SLAH3, ein pflanzlicher Anionenkanal an dessen N-Terminus das C-terminale YFP-Fragment fusioniert wurde, gemeinsam mit ChR2-WT::YFP<sup>N</sup> in Oozyten exprimiert. Sowohl in diesem Ansatz, als auch bei Koexpression von ChR2-WT::YFP<sup>N</sup> mit BR-WT::YFP<sup>C</sup> konnte keine Fluoreszenz beobachtet werden. Nicht nur ein Aggregationseffekt sondern auch eine Interaktion von ChR2 und BR konnte somit ausgeschlossen werden. Bei der Expression von ChR2-WT::YFP<sup>N</sup> mit ChR2-WT::YFP<sup>C</sup> trat ein deutliches YFP-Signal auf, was auf eine Interaktion dieser Proteine hinwies. Injizierte man ChR2-WT::YFP<sup>N</sup> mit ChR2-C128T::YFP<sup>C</sup> konnte ebenfalls ein Fluoreszenzsignal erfasst werden.



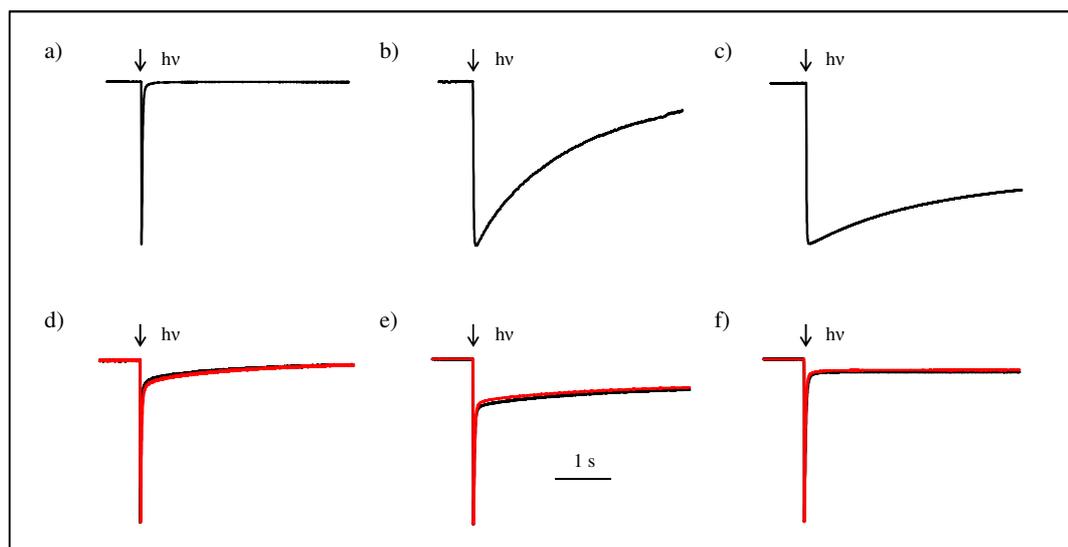
**Abb. 3.14:** Interaktion von Channelrhodopsin Wildtypformen und Mutanten in *X. laevis* Oozyten. (a) Koexpression von ChR2-WT::YFP<sup>N</sup> und YFP<sup>C</sup>. (b) Koexpression von ChR2-WT::YFP<sup>N</sup> und YFP<sup>C</sup>::SLAH3. (c) Koexpression von ChR2-WT::YFP<sup>N</sup> und BR::YFP<sup>C</sup>. (d) Koexpression von ChR2-WT::YFP<sup>N</sup> und ChR2-WT::YFP<sup>C</sup>. (e) Koexpression von ChR2-WT::YFP<sup>N</sup> und ChR2-C128T::YFP<sup>C</sup>. (f) Koexpression von ChR2-WT::YFP<sup>N</sup> und ChR1-WT::YFP<sup>C</sup>. Für eine Einzel-Expressionen wurden 20 ng RNA, bei Koexpression 10 ng beider RNA-Sorten injiziert. Optische Schnitte wurden an einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop bei einer Anregung mit 514 nm angefertigt.

Aufgrund der Homologie von ChR1 und ChR2 und der Tatsache, dass Mutationen identischer Aminosäuren in ChR1 und ChR2 ähnliche Auswirkungen auf Kinetik und Expression haben, sollte getestet werden, ob eine Interaktion auch zwischen ChR1 und ChR2 möglich ist. Hierfür wurde RNA von ChR1-WT::YFP<sup>C</sup> in Kombination mit ChR2-WT::YFP<sup>N</sup> in Oozyten injiziert und exprimiert. Ein deutliches Fluoreszenzsignal bestätigte, dass auch zwischen ChR1 und ChR2 Untereinheiten eine Interaktion stattfindet.

### 3.3.3 Koexpression von ChR2 Varianten

Elektrophysiologische Untersuchungen sollten weitere Informationen bezüglich der Tertiär- und Quartärstruktur von ChR2 *in vivo* liefern. Um Aussagen über den Aufbau der Porenregion machen zu können wurden Mischungen aus zwei ChR2 Varianten, die aufgrund unterschiedlicher Schließzeiten klar unterscheidbar waren, in einem 1 plus 1 und

3 plus 1 Verhältnis in Oozyten exprimiert. Anschließend wurde der Stromverlauf bei einer kurzen Anregung für 5 ns mit blauem Laserlicht aufgezeichnet. Zusätzlich wurden die Stromkurven bei Koexpression zweier RNA-Sorten normiert und mit den Stromverläufen überlagert, die bei unabhängig voneinander agierenden Untereinheiten zu erwarten waren. Für deren Berechnung wurden die gemessenen Werte der einzeln exprimierten Kanaltypen entsprechend des injizierten Verhältnisses multipliziert, addiert und anschließend normiert.



**Abb. 3.15:** Stromantworten einzeln und koexprimierter ChR2 Varianten bei kurzer Belichtung in Oozyten von *X. laevis*. Dargestellt sind die normierten Stromverläufe von (a) ChR2-WT, (b) ChR2-C128T und (c) ChR2-D156A nach Anregung für 5 ns bei 473 nm. (d-f) Überlagerung der berechneten (rot) und gemessenen Photoströme (schwarz) bei Koexpression von (d) ChR2-WT und ChR2-C128T im Verhältnis 1 zu 1, (e) ChR2-WT und -D156A im Verhältnis 1 zu 1 und (f) ChR2-WT und -D156A im Verhältnis 3 zu 1. Bei der Expression in gleichen Verhältnissen wurden jeweils 10 ng RNA, bei einem 3 zu 1 Verhältnis 15 ng + 5 ng RNA injiziert. Die elektrischen Messungen wurden in einer Ringerlösung pH 7,6 bei einer angelegten Spannung von -100 mV durchgeführt. Die Anregung mit 473 nm für 5 ns erfolgte mit einem Nd:YAG Pulslaser.

Abb. 3.15 zeigt, dass die Kanäle bei der Einzeldexpression mit den in 3.1.2 bestimmten Schließzeiten von 15 ms bei ChR2-WT, 1,7 s bei C128T und mehr als 100 s bei D156A schlossen. Bei einer Koexpression zweier Kanalvarianten, trat ein biphasischer Schließvorgang auf, dessen Zeitkonstanten mit denen der eingesetzten Kanalvarianten übereinstimmten (Tab. 3.5). Ein weiteres Ergebnis war, dass die Stromkurven aller

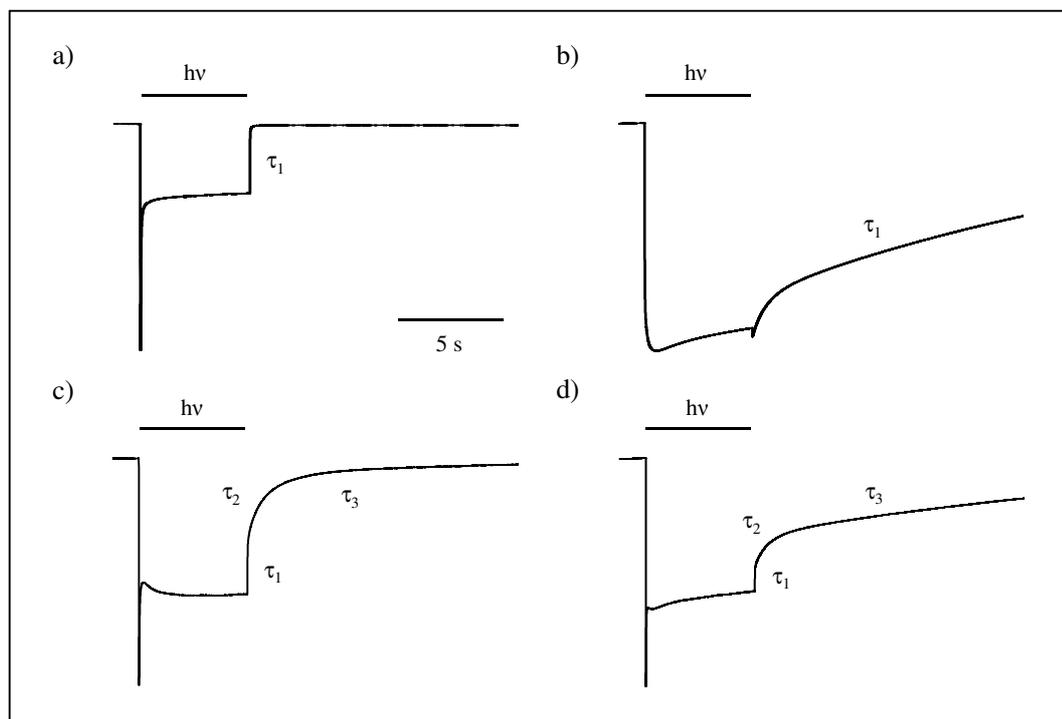
Koexpressionsansätze deckungsgleich mit denen verliefen, die bei unabhängig voneinander agierenden Untereinheiten zu erwarten waren.

**Tab. 3.5:** Gegenüberstellung der Schließzeiten bei Einzel- und Koexpression verschiedener ChR2 Varianten bei Belichtung für 5 ns mit 473 nm.

Typ	$\tau_{\text{off}}$	Mischung	$\tau_1$	$\tau_2$
WT	15 ms	-	-	-
C128T	1,7 s	WT/C128T	12 ms	1,4 s
C128A	40 s	WT/C128A	21 ms	38 s
D156A	>100 s	WT/D156A	19 ms	>100 s

### 3.3.4 Stromverlauf bei langer Belichtung

Um die Stromverläufe bei der Koexpression unterschiedlicher ChR2-Varianten auch bei längerer Belichtung zu untersuchen, wurden, analog zu den in 3.3.3 durchgeführten Experimenten, Kombinationen von ChR2-WT, -C128T, -C128A und D156A RNA in gleichen Verhältnissen in Oozyten injiziert und die Photoströme bei einer Belichtung für 5 s aufgezeichnet.



**Abb. 3.16:** Elektrische Messungen bei Einzel- und Koexpression von ChR2 Varianten in Oozyten. Photoströme bei Expression von (a) 20 ng ChR2-WT, (b) 20 ng ChR2-D156A, (c) 10 ng ChR2-WT + 10 ng ChR2-C128T und (d) 10 ng ChR2-WT + 10 ng ChR2-D156A RNA. Messungen wurden in einer Ringerlösung mit pH 7,6 bei einer angelegten Spannung von -100 mV durchgeführt. Die Belichtung (hv) erfolgte für 5 s bei einer Wellenlänge 473 nm ( $8 \text{ mW/mm}^2$ ).

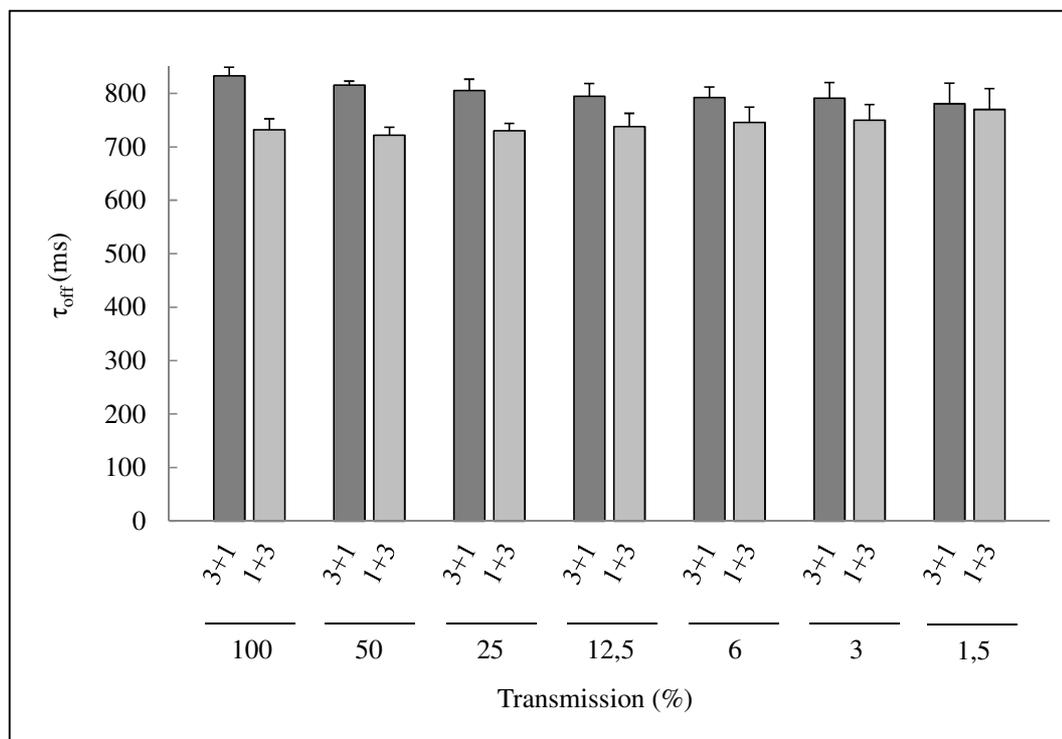
Wie in Abb. 3.16 zu erkennen ist, traten bei der längeren Belichtung einer Mischung aus zwei Kanaltypen drei Schließzeiten auf. Dabei entsprach der höchste und niedrigste Wert den Zeitkonstanten der einzelnen Kanalvarianten, der dritte lag zwischen beiden Werten.

**Tab. 3.6:** Gegenüberstellung der Schließzeiten bei Einzel- und Koexpression verschiedener ChR2 Varianten bei 5 s Belichtung mit 473 nm.

Typ	$\tau_{\text{off}}$	Mischung	$\tau_1$	$\tau_2$	$\tau_3$
WT	15 ms	WT/C128T	15 ms	$0,2 \pm 0,1 \text{ s}$	$1,2 \pm 0,1 \text{ s}$
C128T	1,7 s	WT/D156A	13 ms	$0,1 \pm 0,05 \text{ s}$	>100 s
C128A	40 s	C128T/C128A	$1,1 \pm 0,1 \text{ s}$	$8,6 \pm 1,2 \text{ s}$	$30 \pm 1 \text{ s}$
D156A	>100 s	C128T/D156A	$1,5 \pm 0,4 \text{ s}$	$2,8 \pm 0,6 \text{ s}$	>100 s

### **3.3.5 Schließzeiten bei unterschiedlichen Lichtintensitäten**

Wie in 3.1.4 gezeigt unterschieden sich ChR2 Wildtyp und Mutanten deutlich in Ihren Halblichtsättigungsintensitäten. Eine Belichtung mit niedrigen Lichtintensitäten war daher eine Möglichkeit ausschließlich die mutierten Untereinheiten in einem heterodimeren Kanal aus ChR2-WT und -C128T anzuregen. Um diesen Sachverhalt zu überprüfen wurde ChR2-WT und -C128T in einem Verhältnis von 1 plus 3 und 3 plus 1 in Oozyten von *X. laevis* exprimiert. Nach einer Belichtung für 5 s wurde die Schließzeitkonstante des mono-exponentiell gefitteten, langsam schließenden Stromverlaufs bei ansteigender Lichtintensität bestimmt.



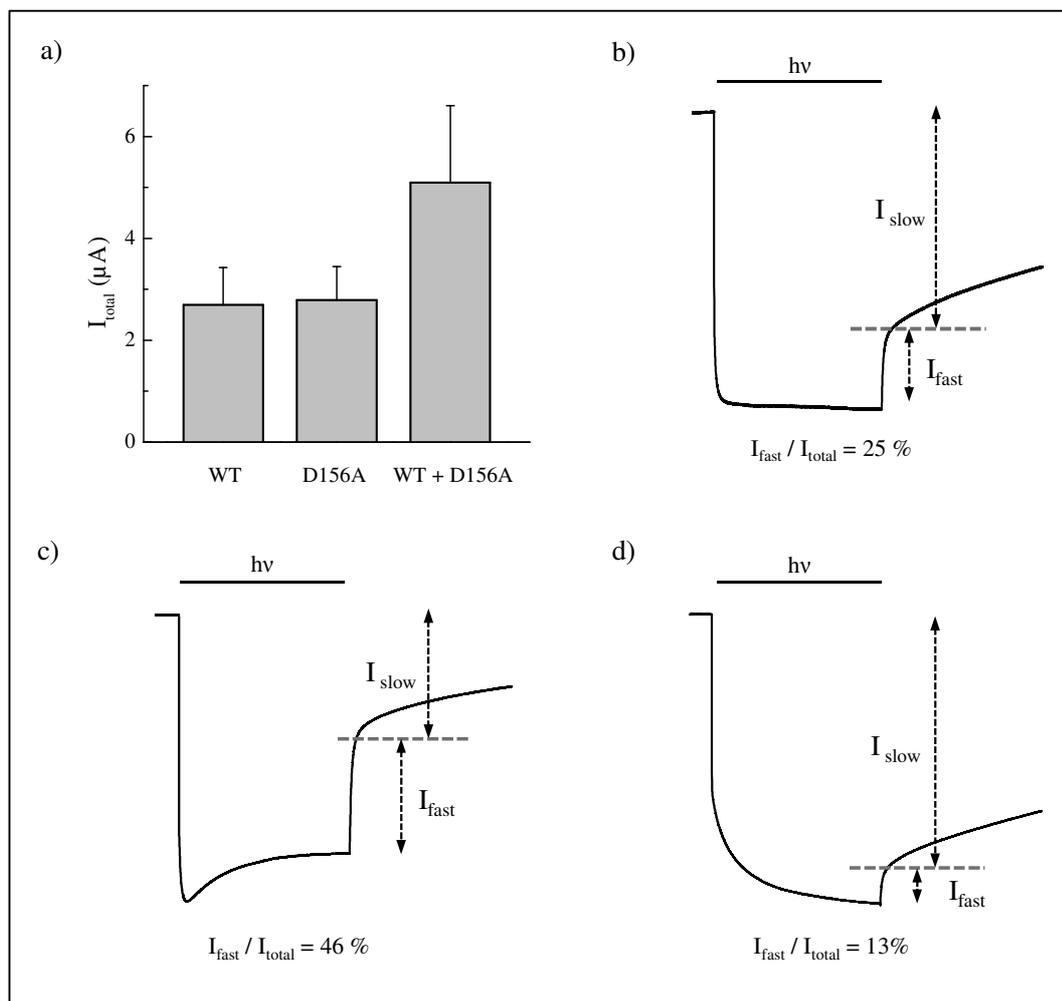
**Abb. 3.17:** Schließzeiten des langsam schließenden Stromanteils bei Koexpression von ChR2-C128T und -WT in verschiedenen Verhältnissen. In Oozyten von *X. laevis* wurden 15 ng ChR2-C128T und 5 ng ChR2-WT (3 + 1) RNA bzw. 5 ng ChR2-C128T und 15 ng ChR2-WT (1 + 3) RNA injiziert. Elektrische Messungen wurden in einer Ringer-Lösung (pH 7,6) bei einer Spannung von -100 mV aufgezeichnet. Die Belichtung erfolgte durch einen Dioden-gepumpten Festkörperlaser der Wellenlänge 473 nm mit einer Intensität von 8 mW/mm<sup>2</sup> (100 % Transmission). Für die Abschwächung der Lichtintensität wurden Neutraldichtefilter (ND 0,3) eingesetzt.

Abb. 3.17 zeigt, dass nach einer Anregung mit hoher Lichtintensität (100 % Transmission) bei den Expressionsverhältnissen 3 plus 1 und 1 plus 3 unterschiedliche Schließzeiten des langsam schließenden Stromanteils auftraten (840 ms bzw. 740 ms). Mit absteigender Lichtintensität konvergierten diese auf einen Wert von 770 ms bei einer Transmission von 1,5 %.

### 3.3.6 Quantitative Analyse

Bei den in 0 durchgeführten elektrophysiologischen Versuchen wurde die Interaktion der Channelrhodopsin-Untereinheiten über die Schließzeiten bei Koexpression

unterschiedlicher Kanaltypen untersucht. Aufbauend darauf sollte die Bildung von Hetero-Oligomeren zusätzlich quantitativ über das Verhältnis der auftretenden Stromverläufe bei Koexpression von ChR2-Wildtyp und -D156A untersucht werden. Die RNA dieser ChR2-Varianten wurde in verschiedenen Mengen (1 plus 1, 3 plus 1 und 1 plus 3) in Oozyten exprimiert und im Laufe elektrischer Messungen der Anteil des schnell schließenden Photostroms am Gesamtstrom bestimmt.



**Abb. 3.18:** Photoströme bei Koexpression von ChR2-WT und -D156A in verschiedenen Verhältnissen. (a) Stromamplituden bei Ko- und Einzelinjektionen von 10 ng Wildtyp und 10 ng ChR2-D156A. (b) Stromspur und schnell schließender Stromanteil bei Expression von 10 ng Wildtyp und 10 ng ChR2-D156A. (c) Stromspur und schnell schließender Stromanteil bei Expression von 15 ng Wildtyp und 5 ng ChR2-D156A. (d) Stromspur und schnell schließender Stromanteil bei Expression von 5 ng Wildtyp und 15 ng ChR2-D156A. Die elektrischen Messungen wurden in einer Ringerlösung mit pH 7,6 bei einer angelegten Spannung von -100 mV durchgeführt. Die Belichtung (hv) erfolgte für 5 s bei einer Wellenlänge 473 nm ( $8 \text{ mW}/\text{mm}^2$ ).

Abb. 3.18 zeigt, dass die Stromamplituden bei den einzeln injizierten Kanaltypen (10 ng RNA) jeweils 2,5  $\mu\text{A}$ , bei gemeinsamer Expression 5  $\mu\text{A}$  betragen. Wildtyp- und mutierter Kanal trugen demnach in gleichen Verhältnissen zum Gesamtstrom bei. Allerdings machte bei einer Koexpression im Verhältnis 1 zu 1 der Anteil des schnell schließenden Stroms am

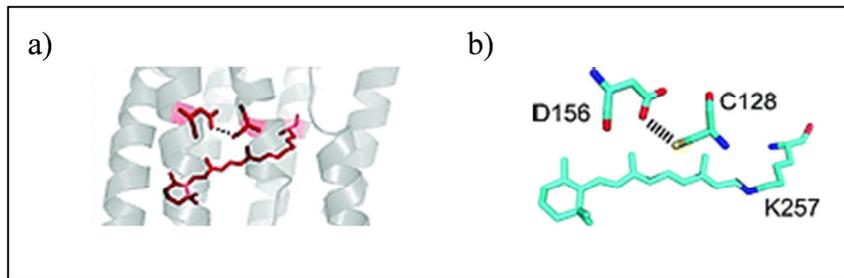
Gesamtstrom lediglich 25 % aus. In Oozyten, die die dreifache Menge an Wildtyp-Kanal (15 ng Wildtyp und 5 ng ChR2-D156A) exprimierten, erhöhte sich dieser auf 47 %, während er bei der Expression der dreifachen Menge D156A (5 ng Wildtyp und 15 ng ChR2 D156A) auf 13 % abnahm.

## 4. Diskussion

### 4.1 Untersuchung von ChR2 Mutanten

#### 4.1.1 Wasserstoffbrücken in ChR2

Die Ausbildung von Wasserstoffbrücken ist neben Disulfidbrücken eine wichtige strukturbestimmende Bindungskraft in membranären Proteinen (White, 2006). Insbesondere bei  $\alpha$ -helical aufgebauten Membranproteinen, wie Rezeptoren und Kanälen, tragen intra- und interhelikale Wasserstoffbrücken entscheidend zur Stabilität der Sekundär- und Tertiärstruktur bei (Popot *et al.*, 2000; Adamian *et al.*, 2002). In Bakteriorhodopsin wird im Zentrum des Proteins eine Wasserstoffbrücke zwischen T90 und D115 ausgebildet (Essen *et al.*, 1998; Royant *et al.*, 2000). Mutanten wie etwa T90A, bei denen die Bildung dieser Wasserstoffbrücke nicht mehr möglich war zeigten mit nur 10 % Effizienz eine deutlich reduzierte Protonenpumpaktivität im Vergleich zum Wildtyp, sowie eine stark verlangsamte Photozyklus-Kinetik (Peralvarez *et al.*, 2001). In weiterführenden Untersuchungen wurde gezeigt, dass diese Wasserstoffbrücke auch eine wichtige Rolle bei der Koordination der dynamischen Abläufe in der zytoplasmatischen Hälfte des Proteins und bei der Reprotonierung der Schiff'schen Base durch den primären Protonendonator D96 spielt (Peralvarez-Marín *et al.*, 2004). Aufgrund der hohen Homologie der umgebenden Bereiche und spektroskopischer Untersuchungen von Nack *et al.* (2010) wurde zu Beginn dieser Arbeit davon ausgegangen, dass die oben beschriebene Interaktion auch zwischen den korrespondierenden Aminosäuren C128 und D156 in ChR2 existiert (Abb. 4.1).



**Abb. 4.1:** Homologiemodell der Retinalbindetasche in ChR2 auf Basis der Kristallstruktur von SR II aus *Natronomonas pharaonis* (a). Das Chromophor ist als Schiff'sche Base kovalent an das Lysin 257 gebunden. Die in unmittelbarer Nähe gelegenen Seitenketten der D156- und C128-Reste bilden eine Wasserstoffbrücke zwischen der Thiol-Gruppe in C128 und der protonierten Carboxy-Gruppe in D156 (gestrichelte Linie) (b). Übernommen aus Nack *et al.* (2010)

Berndt *et al.* (2009) und die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigten bei ChR2-C128T, -C128A und -D156A eine, im Vergleich zum Wildtyp, 100- bis 1000-fach verlangsamte Kinetik. Die längeren Schließ- und Öffnungszeiten der mutierten Kanäle stimmen gut mit der verlängerten Lebensdauer spektroskopisch bestimmter Intermediate im Photozyklus von Bamann *et al.* (2010) und Stehfest *et al.* (2010) überein. Berndt *et al.* (2009) begründen die Auswirkung auf die Kinetik mit der höheren Polarisierbarkeit der C128-Thiolgruppe. Im Vergleich zu den Threonin- und Serinresten aller anderen mikrobiellen Rhodopsinen könnte die Interaktion eines Cysteins mit der Polyenstruktur des Retinals Prozesse wie Isomerisierung, Protonierung und Reisoomerisierung beschleunigen. Umgekehrt könnte eine Mutation dieses Cysteins zu einer verlangsamten Ausbildung des leitenden und der Reisoomerisierung in den anregbaren Zustand führen.

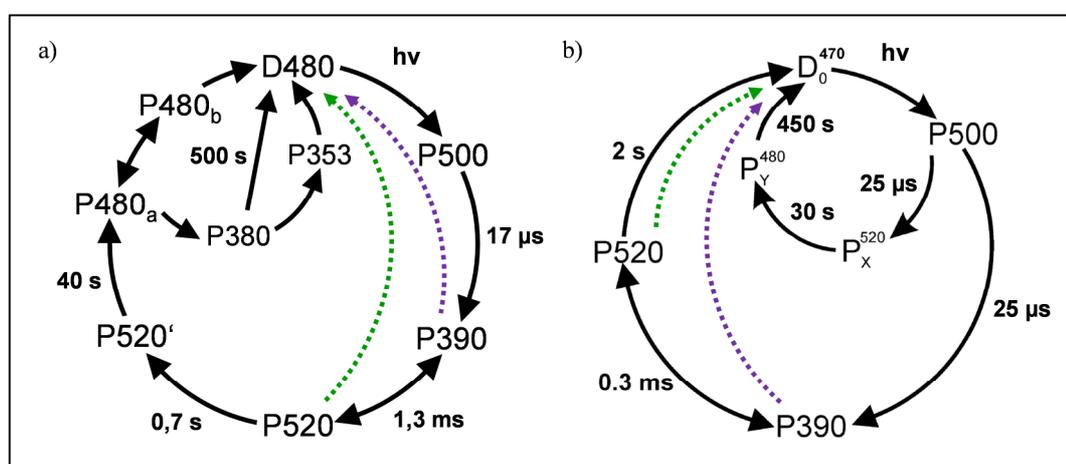
Diese Verlangsamung wirkte sich auch auf andere Bereiche des Photozyklus aus. Beispielsweise ist der Übergang vom Spitzenstrom in den stationären Strom bei kontinuierlicher Belichtung abhängig von der Lebensdauer desensitierter Zustände des Kanals. Diese nahm von Werten im Millisekunden-Bereich beim Wildtyp auf Sekunden bei ChR2-C128T und -C128A zu. Im Falle von ChR2-D156A war sogar kein Rückgang auf einen stationären Strom zu beobachten. Des Weiteren korrelierte die verlängerte Öffnungs- und Schließzeit und die damit verbundene Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit bei allen langsam schließenden Mutanten mit einer Zunahme der Lichtsensitivität. Im Vergleich zum

Wildtyp war die Lichtempfindlichkeit der Mutanten bis zu 70fach höher. Auffällig an den Ergebnissen ist, dass auch Mutationen von D156 identische Auswirkungen auf den Stromverlauf haben. Dies ist ein weiteres Indiz für die Interaktion dieser Reste, möglicherweise in Form einer Wasserstoffbrücke.

Interessanterweise haben Mutationen dieser Reste nur einen geringen Einfluss auf andere physikalische Parameter wie Leitfähigkeit, Ionenselektivität oder maximale Anregungswellenlänge. Aufgrund dessen erscheint eine Beteiligung an Prozessen innerhalb der Porenregion, vergleichbar zum vektoriellen Protonentransport in Bakteriorhodopsin, unwahrscheinlich.

#### 4.1.2 Beschleunigtes Schließen

Bamann *et al.* (2010) und Stehfest *et al.* (2010) konnten mittels spektroskopischer Analysen zwei, zum großen Teil übereinstimmende, Modelle des Photozyklus der langsam schließenden Mutante ChR2-C128T erstellen (Abb. 4.2).



**Abb. 4.2:** Vergleich der Photozyklusmodelle von ChR2-C128T aus (a) Stehfest *et al.* (2010) und (b) Bamann *et al.* (2010). Die Lichtreaktionen der P390 und P520 Photointermediate sind in beiden Modellen mit grün bzw. violett gestrichelten Pfeilen gekennzeichnet.

Die in 3.1.5 beschriebenen elektrischen Messungen, bei denen eine Belichtung von ChR2-C128T, -C128A und -D156A mit violetter (405 nm) und grünem Licht (532 nm)

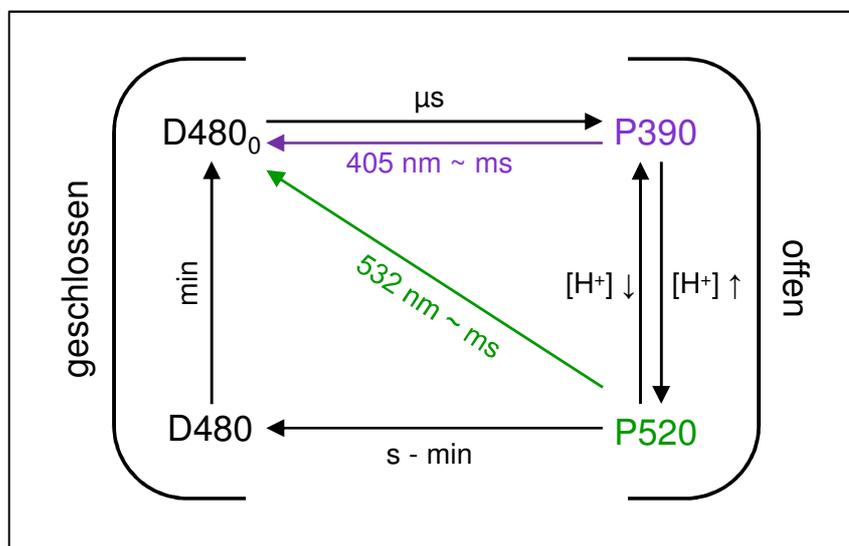
zu einem schnelleren Schließen des Kanals führte, lassen sich durch die in Abb. 4.2 dargestellten Photoreaktionen der P520 und P390 Intermediate in beiden Zyklusmodellen erklären. Analog zu der in Bakteriorhodopsin stattfindenden Rückreaktion des M-Intermediates in den Grundzustand durch Absorption eines blauen Photons (Ohno *et al.*, 1983; Ludmann *et al.*, 1999), könnte die Absorption der P520 und P390 Intermediate eines grünen bzw. violetten Photons bei Channelrhodopsinen die Rückkehr in den geschlossenen Grundzustand D480 beschleunigen. Dies würde auch den kurzen transienten Stromanstieg nach Ausschalten des Anregungslichts bei ChR2-C128A und -D156A erklären (Abb. 3.5). Während der Anregung mit blauem Licht findet bei einem Teil der leitenden P390 und P520-Intermediate eine kontinuierliche Photoisomerisation in den nichtleitenden P480 Zustand statt. Das Ausschalten des Lichts würde zu einer kurzzeitigen Ansammlung des leitenden P520 Intermediats aus dem Grundzustand führen und damit auch zu einem Anstieg des Photostroms (Berndt *et al.*, 2009; Bamann *et al.*, 2010).

Während die Photoreaktion des P520 Intermediates in den Grundzustand bereits im ChR2 Wildtyp beschrieben wurde (Bamann *et al.*, 2008), konnte der inhibitorische Effekt einer Reaktion des P390 Intermediates erst mithilfe der in dieser Arbeit erstellten stark verlangsamten ChR2-Mutanten nachgewiesen werden. Die Verwendung von grünem und violettem Licht nach der Anregung überbrückt daher gewissermaßen einen Teil des Photozyklus und erlaubt somit die Kontrolle der Channelrhodopsinaktivität. Diese Steuerbarkeit in Kombination mit der stark erhöhten Lichtsensitivität erweitert die Einsatzmöglichkeiten von Channelrhodopsinen in biologischen und medizinischen Anwendungen erheblich.

#### **4.1.3 pH-Abhängigkeit**

Darüber hinaus erlaubte der langsamer ablaufende Photozyklus dieser Mutanten auch die Zuordnung spezifischer Photointermediate zu definierten kinetischen Zuständen des Kanals. Die in 3.1.5 gezeigte beschleunigte Rückreaktion durch grünes bzw. violettes Licht zeigt, dass sowohl P390 als auch P520 im offenen Zustand existieren müssen, was auf eine schnell ablaufende Gleichgewichtsreaktion dieser Intermediate hindeutet. Bei den in 3.1.5 durchgeführten Messungen an ChR2-C128A führte eine Belichtung mit 532 nm immer zu

einem beschleunigten Rückgang in den Grundzustand. Im Gegensatz dazu, war der Effekt bei einer Belichtung mit 405 nm stark vom pH-Wert des umgebenden Mediums abhängig. Während bei einer niedrigen Protonenkonzentration eine Belichtung zu einer Inhibierung führte, konnte bei einer hohen Protonenkonzentration eine Aktivierung des Kanals beobachtet werden. Basierend auf den Ergebnissen dieser Messungen und den in Abb. 4.2 dargestellten Photozyklen wurde ein Schema erstellt (Abb. 4.3), das die auftretenden Prozesse unter Berücksichtigung der zeitlichen Größenordnungen und den zugehörigen Photoreaktionen bei unterschiedlichen pH-Werten darstellt.



**Abb. 4.3:** Schematische Darstellung der Zyklusreaktionen und ihren zeitlichen Parametern bei ChR2-C128A im offenen und geschlossenen Zustand. Die Lichtreaktionen der P390 und P520 Intermediate in den Grundzustand D480 sind durch grüne bzw. violette Pfeile gekennzeichnet. P390 und P520 befinden sich in einem protonenabhängigen Gleichgewicht.

Ritter *et al.* (2008) und Ernst *et al.* (2008) ordnen das P390 Photointermediat der deprotonierten Schiff'schen Base zu, die durch Reprotonierung in das rotverschobene P520 Intermediat übergeht. Die elektrischen Messungen stehen dazu in guter Übereinstimmung. Eine niedrige Protonenkonzentration im umgebenden Medium würde eine längere Lebensdauer und Akkumulation des deprotonierten P390 Intermediates begünstigen. Bei diesen Bedingungen hätte eine Belichtung mit violetterem Licht eine beschleunigte Rückreaktion in den geschlossenen Grundzustand D480 zur Folge. Eine hohe

Protonenkonzentration hingegen, würde das Gleichgewicht auf die Seite des reprotonierten P520 Intermediates verschieben und so zu einer Verarmung des P390 Intermediates führen. Unter diesen Bedingungen würde bei einer Belichtung mit 405 nm der aktivierende Effekt überwiegen und zu einer Anregung des Kanals führen.

### 4.1.4 Retinalabhängigkeit

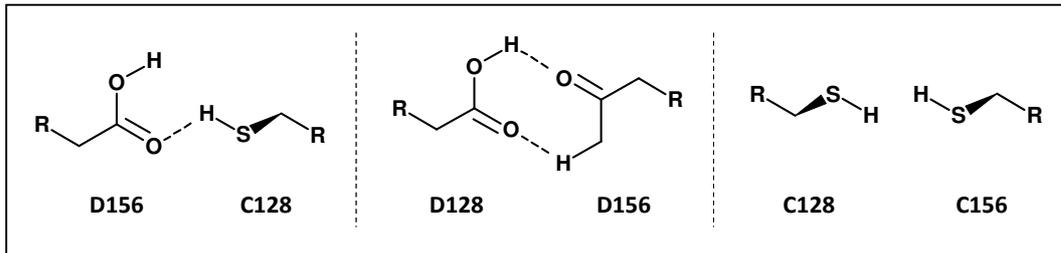
Die Konzentration von all-*trans*-Retinal im Blut-Plasma eines ausgewachsenen weiblichen Exemplars von *X. laevis* liegt bei ca. 10 nM, in Oozyten 25  $\mu$ M (Azuma *et al.*, 1993). Aufgrund dessen ist eine Zugabe des Chromophors bei der heterologen Expression von Channelrhodopsinen in Oozyten nicht unbedingt erforderlich. Allerdings konnten die Photoströme durch eine Erhöhung der Retinalkonzentration auf 10  $\mu$ M während der Inkubation um das 10fache angehoben werden. In 3.1.7 wurde die Expression von Channelrhodopsin Mutanten in An- und Abwesenheit von externem all-*trans*-Retinal untersucht. In Oozyten wurden identische Mengen kodierender RNA eines Fusionskonstrukts aus Channelrhodopsin und dem fluoreszenten Protein YFP injiziert und mittels Laserscanning Mikroskopie die Stärke der Fluoreszenzsignale verglichen. Interessanterweise zeigten ChR2-C128T, -C128A und D156A unter beiden Bedingungen eine deutlich höhere Expression als die Wildtypform, wobei das Verhältnis der Fluoreszenzstärke mit und ohne Retinal (etwa 5:1) hingegen erhalten blieb.

Die Integration des hydrophoben Chromophors in die Retinalbindetasche ist für die Funktion des Proteins zwingend notwendig. Diese Tatsache in Kombination mit den unterschiedlichen Proteinmengen ohne externe Retinalzugabe wirft Fragen bezüglich der Synthese und Stabilität der Channelrhodopsin-Mutanten auf. Eine mögliche Erklärung für die erhöhte Expression wäre eine gesteigerte Aktivität des Protein-Syntheseapparates. Da alle Konstrukte bis auf den Austausch einer Aminosäure identisch zum Wildtyp sind und auch Mutationen an unterschiedlichen Positionen den gleichen Effekt haben, erscheint dies unwahrscheinlich. Aus demselben Grund ist auch eine erhöhte Resistenz gegen den Abbau (bspw. durch das Ubiquitin-Proteasom-System) aufgrund einer internen Stabilisierung ohne Chromophor wenig plausibel. Denkbar wäre eine erhöhte Affinität zum Chromophor, gleichbedeutend mit einer besseren Verwertbarkeit von endogen vorhandenem

*all-trans*-Retinal. Letztlich könnte das Chromophor aufgrund von mutationsbedingten Ladungsverschiebungen in der Retinalbindetasche und deren unmittelbarer Umgebung, durch strukturell kompatible Moleküle aus der Klasse der Retinoide substituiert werden und das Protein somit vor dem Abbau schützen. Ein Beispiel hierfür wäre das *all-trans*-Retinol, das im animalen System durch Reduktion des *all-trans*-Retinals entsteht. Eine Beteiligung solcher substituierten Moleküle erscheint ebenfalls unwahrscheinlich, da die Stromamplituden deutlicher geringer sein müssten. Allerdings trat bei keiner, der in dieser Arbeit angefertigten Mutanten ein reduzierter Photostrom bei gleichzeitiger höherer Expression auf; die Stromamplituden vieler Mutanten waren sogar deutlich erhöht. Welcher dieser Faktoren, allein oder in Kombination, für die erhöhte Expression verantwortlich ist muss im Rahmen weiterführender Arbeiten genauer untersucht werden. Dies ist auch im Hinblick darauf wichtig, dass die Verfügbarkeit von *all-trans*-Retinal einen limitierenden Faktor bei der Expression von Channelrhodopsinen in heterologen Zellsystemen darstellt.

#### **4.1.5 Mehrfachmutanten**

Auf die Bedeutung der Wasserstoffbrückenbindung zwischen C128 und D156 für die Kanalaktivität wurde bereits in 3.1.1 eingegangen. In 3.1.8 wurde die Bildung dieser Bindung durch Austausch der beteiligten Reste genauer untersucht und folgende Mutanten elektrophysiologisch charakterisiert: ChR2-C128D, ChR2-D156C und ChR2-C128D/D156C. In Abb. 4.4 erkennt man, dass sich im Gegensatz zu ChR2-D156C die Stromverläufe von ChR2-C128D und -C128D/D156C kinetisch nur wenig unterscheiden. Folglich hat in ChR2-C128D eine Substitution des Cysteins 128 durch Aspartat nur einen geringen Einfluss auf die Wasserstoffbrückenbildung zwischen den Resten an Position 128 bzw. 156. Eine Erklärung hierfür wäre der polare Charakter der Carboxy-Gruppe des Aspartat. Diese könnte ähnlich wie in Carbonsäure-Dimeren auch in ChR2-C128D, Wasserstoffbrücken ausbilden, deren Wirkung für den korrekten Ablauf des Photozyklus ausreicht.



**Abb. 4.4:** Kombination der Seitenreste von ChR2-C128 und ChR2-D156. Mögliche Wasserstoffbrücken sind gestrichelt dargestellt. Wird das Aspartat an Position 156 durch ein Cystein substituiert (letztes Bild) kann keine Wasserstoffbrücke mehr ausgebildet werden.

In ChR2-D156C wurde Aspartat an Position 156 durch ein zweites Cystein ersetzt. Die weniger starken polaren Eigenschaften der Thiolgruppen spricht gegen die Bildung einer Wasserstoffbrücke zwischen den Cysteinen 128 und 156 (Abb. 4.4). Zwar bestünde die Möglichkeit, dass Disulfidbrücken gebildet werden könnten, diese hätte aber wahrscheinlich nicht den gleichen koordinierenden Effekt wie die Wasserstoffbrücke im Wildtyp-Kanal und könnte die Kanalfunktion auch beeinträchtigen. Dies würde auch eine Erklärung für die ausgeprägte Verlangsamung des Photozyklus und die außergewöhnlich hohen Stromamplituden von bis zu  $50 \mu\text{A}$  liefern. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an Oozyten die ChR2-D156C ohne zusätzliches Retinal während der Inkubation exprimierten, besaßen im Vergleich zu allen anderen Mutanten das stärkste Fluoreszenzsignal. Die verstärkte Expression, möglicherweise in Kombination mit der Bildung einer Disulfidbrücke (oder keiner Bindung) statt einer Wasserstoffbrücke und eine erhöhte Einzelkanalleitfähigkeit, könnten Gründe für diese hohen Stromamplituden sein. Ursächlich für die Tatsache, dass eine Belichtung mit grünem oder violetterem Licht nicht zu einem schnelleren Schließen führt, könnte die sehr hohe Lichtsensitivität aufgrund der extrem langsamen Kinetik dieser Mutante sein. Bei einer Belichtung mit inhibierenden Wellenlängen würde der aktivierende Anteil des Lichts grundsätzlich überwiegen und zu einer Anregung führen. Sämtliche Messungen an dieser Mutante mussten unter stark abgedunkelten Verhältnissen durchgeführt werden, da bereits geringste Lichtintensitäten Photoströme auslösten.

In elektrischen Messungen der ChR2-C128D/D156C Doppelmutante konnte eine dem Wildtyp ähnliche Kinetik beobachtet werden. Der starke Effekt der D156C-Mutation konnte demnach durch die Mutation des Cysteins an Position 128 in ein Aspartat komplementiert werden. Dieses Ergebnis spricht nicht nur dafür, dass die Bildung der Wasserstoffbrücke bei einem Austausch der im Wildtyp beteiligten Reste C128 und D156 möglich ist, sondern auch dafür, dass deren Orientierung einen geringen Einfluss auf die koordinierende Wirkung des Photozyklus zu haben scheint.

## **4.2 Untersuchung von ChR1 Mutanten**

### **4.2.1 Kinetik**

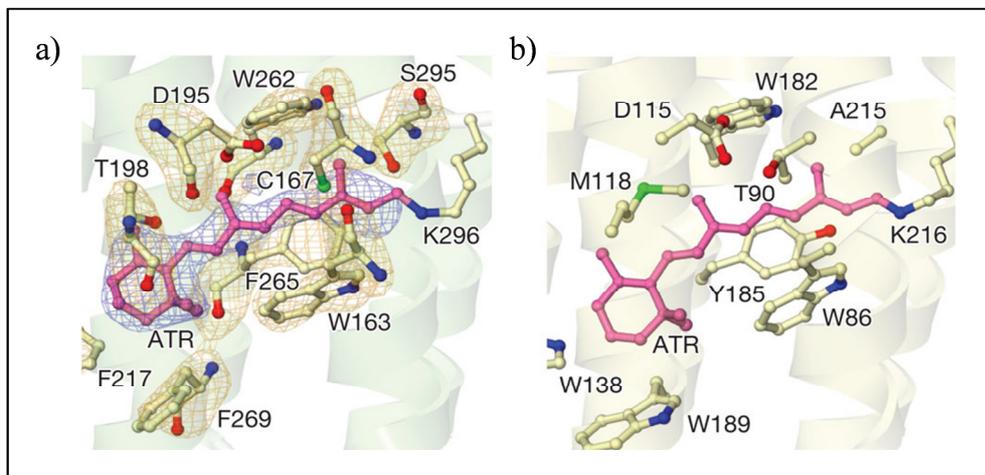
In nahezu allen Anwendungen, bei denen Channelrhodopsine zum Einsatz kamen, beschränkte man sich auf die Wildtypform von ChR2 oder dessen Mutanten. Ein wichtiger Grund hierfür sind die für den anwendungsbezogenen Bereich eher ungünstigen Eigenschaften von ChR1, wie ein niedriges Expressionsniveau, eine veränderte Ionenselektivität und die geringen Photoströme. Mit der zum Ende dieser Arbeit publizierten Kristallstruktur eines chimären Proteins aus TM 1-5 aus ChR1 und TM 6-7 von Kato *et al.* (2012) gewinnen die hier durchgeführten Untersuchungen mit ChR1 entschieden an Bedeutung. Die Ergebnisse bezüglich der funktionellen und strukturellen Unterschiede zwischen ChR1 und ChR2 liefern Hinweise darauf, bis zu welchem Grad die Eigenschaften des chimären Proteins auf einen ausschließlich aus ChR2 aufgebauten Kanal übertragbar sind.

Nagel *et al.* (2002) beschrieben ChR1 als einen aus 7 Transmembranhelices aufgebauten, lichtaktivierbaren Kationenkanal mit einem im Vergleich zu ChR2 rot verschobenen Anregungsmaximum bei 500 nm. Wegen der hohen Homologie der 3. und 4. Transmembranhelix zwischen ChR1 und ChR2 mit einer Sequenzidentität von 60% sollte getestet werden ob sich die in ChR2 durchgeführten Mutationen ähnlich auf ChR1 auswirkten. Hierfür wurden die folgende Mutanten hergestellt und sowohl elektrophysiologisch auf die Kinetik als auch fluoreszenzmikroskopisch auf die

Proteinmenge hin untersucht: ChR1-C167A, -C167T, -D195A, -D195C und die Doppelmutante ChR1-C167T/D195C. In elektrischen Messungen trat bei allen Mutanten mit Ausnahme der Doppelmutante C167T/D195C eine geringfügige Verlangsamung der Kinetik auf, diese war aber deutlich weniger ausgeprägt als bei homologen Mutationen in ChR2. Es besteht also ein Unterschied zu ChR2 bei der Wirkung dieser Reste auf die Kanalaktivität.

Ein weiteres Indiz auf Ähnlichkeiten bei den funktionellen Mechanismen von ChR2 und ChR1 sind die im Vergleich zur Wildtypform um den gleichen Faktor erhöhten Stromamplituden (20fach) bei ChR2-D156C und deren homologer Mutante ChR1-D195C. Allerdings traten große Unterschiede bezüglich der Kinetik beider Mutanten auf. Die Schließzeit bei ChR1-D195C ist mit ca. 50 ms wesentlich geringer als die von ChR2-D156C (> 100 s) und liegt somit deutlich näher an der des Wildtyps (20 ms). Der Anstieg der Stromamplitude bei annähernd gleicher Schließzeit lässt sich hier nicht ausschließlich durch eine erhöhte Offenwahrscheinlichkeit aufgrund der verlangsamten Kinetik erklären. Es müssen zusätzliche Parameter durch die Mutation betroffen sein, wie etwa die bereits bei ChR2-Mutanten diskutierte Erhöhung der Einzelkanalleitfähigkeit (4.1.4).

Neben den elektrischen Messungen konnte auch bei fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen von ChR1-WT, -C167A, -C167T, -D195A, -D195C und ChR1-C167T/D195C Gemeinsamkeiten zwischen ChR1 und ChR2 gezeigt werden. Wie in den in 3.2.4 beschriebenen Untersuchungen mit ChR2 korrelierte eine Zunahme des Photostroms stets mit einem Anstieg der Fluoreszenzsignalstärke was einer Erhöhung der Proteinmenge entspricht. Hinzu kam, dass dieser Effekt in beiden Channelrhodopsinen am deutlichsten bei den homologen Mutanten ChR1-D195C und ChR2-D156C ausgeprägt war. Mögliche Ursachen hierfür wurden bereits in 4.1.4 diskutiert, auch in diesem Fall ist eine Festlegung auf einen oder mehrere Faktoren mit den durchgeführten Messungen nicht möglich.



**Abb. 4.5:** Strukturvergleich der Retinalbindetasche und der umgebenden Resten aus (a) C1C2 und (b) Bakteriorhodopsin. Modifiziert nach Kato *et al.* (2012).

Kato *et al.* (2012) stellen im Gegensatz zu Nack *et al.* (2010) und Bamann *et al.* (2010) fest, dass zwischen den Seitenketten von C167 (bzw. C128 in ChR2) und D195 (bzw. D156 in ChR2) keine Wasserstoffbrücke gebildet werden kann, da der Abstand zwischen der Thiolgruppe von C167 und der Carboxy-Gruppe von D195 zu groß ist (Abb. 4.5). Statt einer Bindung mit D195 steht die Thiolgruppe in direktem Kontakt mit dem  $\pi$ -Elektronensystem des all-*trans*-Retinals. Bei ChR2 ist die Bildung einer Wasserstoffbrücke aber nicht auszuschließen, da sich die Struktur dieses Bereiches in ChR1 und ChR2 unterscheiden kann. Dafür sprechen auch die unterschiedlichen Auswirkungen der Mutation von C128 und C167 bzw. D156 und D195 auf die Kinetik von ChR2 und ChR1.

#### 4.2.2 Ionenselektivität

Nagel *et al.* (2002) beschrieben ChR1 als einen für Protonen selektiven Ionenkanal mit einer im Vergleich zu ChR2 deutlich erhöhten Protonenleitfähigkeit. In späteren Untersuchungen konnte auch eine Leitfähigkeit für andere Kationen bestimmt werden (Berthold *et al.*, 2008; Tsunoda *et al.*, 2009). Durch die in 3.2.3 beschriebenen elektrischen Messungen sollte bestimmt werden ob und in welchem Maße sich die Protonenleitfähigkeit der oben beschriebenen ChR1-Mutanten von ChR1- und ChR2-WT unterscheidet. In 3.2.3 erkennt man, dass ChR1 eine 4fach erhöhte Protonenleitfähigkeit im Vergleich zu ChR2

aufweist. Diese konnte durch Mutationen wie ChR1-C167A, -C167T und -D195A um bis zu 50% gesteigert werden, was ein Indiz für eine Auswirkung dieser Reste auf die Porenregion von ChR1 ist.

### 4.2.3 Retinalabhängigkeit

Eine der markantesten Gemeinsamkeiten der untersuchten Channelrhodopsin-Varianten war die ungewöhnlich hohe Stromamplitude bei ChR2-D156C und ChR1-D195C in An- und Abwesenheit zusätzlichen Retinals während der Inkubation. In 3.2.4 wurde die Expression dieser Mutanten fluoreszenzmikroskopisch untersucht und den gemessenen Photoströmen gegenübergestellt. Verglichen mit dem 5fachen Anstieg des Photostroms bei den Wildtypformen nahm dieser Wert bei ChR1-D195C um das 10fache zu, was gut mit den beobachteten Fluoreszenzintensitäten übereinstimmte. Interessanterweise war die Stromzunahme mit zusätzlichem Retinal bei ChR2-D156C kleiner als bei ChR1-D195C. Bei gleichen Verhältnissen müssten die Photoströme dieser Mutante von ca. 15  $\mu\text{A}$  ohne Retinal auf bis zu 100  $\mu\text{A}$  mit Retinal ansteigen. Eine Erklärung für den geringeren Anstieg auf „nur“ 50  $\mu\text{A}$  wäre eine Limitierung der maximal exprimierbaren Channelrhodopsinmenge in Oozyten. Unterstützt wird diese Hypothese durch Arbeiten von Zimmermann *et al.* (2008), bei denen eine Überexpression von Channelrhodopsinen in HEK293-Zellen zu einer deutlichen Beeinträchtigung der Zellmembranintegrität führte.

Durch die in dieser Arbeit hergestellten ChR1 Mutanten konnten nicht nur strukturelle und funktionelle Homologien von ChR1 und ChR2 aufgezeigt, sondern auch das Anwendungsspektrum von Channelrhodopsin 1 erweitert werden. Mit ChR1-D195C steht eine ChR1-Variante zur Verfügung, die die für ChR1 charakteristische erhöhte Protonenleitfähigkeit mit einer im Vergleich zum Wildtyp um das 5-10fachen Steigerung der Stromamplitude kombiniert und dabei eine nur minimal verlangsamte Kinetik aufweist.

Ein Einsatzgebiet wäre die Untersuchungen der Aktivität von integralen Membranproteinen bei unterschiedlichen Protonenkonzentrationen *in vivo*. Beispiele hierfür sind die, für die Aufrechterhaltung des elektrochemischen Gradienten verantwortlichen Protonenpumpen in den Membranen von Mitochondrien und

Chloroplasten. Ein weiteres Beispiel sind Protonen Kotransportsysteme wie sie etwa bei dem Kotransport von Lactat und Protonen in Skelettmuskelfaserzellen im animalen System (Juel, 1996) oder dem Kotransport von Aminosäuren und Zuckern mit Protonen über die Zellmembran im pflanzlichen System (Baker, 1978) vorkommen.

### **4.3 Strukturelle Untersuchungen**

Da zu Beginn dieser Arbeit die Struktur von Channelrhodopsinen noch nicht bekannt war, basierten die Untersuchungen größtenteils auf Strukturvorhersagen durch Homologiemodellierung. Mit den in 3.1.1 und 3.2 erstellten stark verlangsamten Mutanten stand ein Werkzeug zur Verfügung, um eine mögliche Oligomerisierung von Channelrhodopsinen (analog zu BR und HR) zu untersuchen. Mittels der in 3.3 beschriebenen biochemischen, elektrophysiologischen und fluoreszenzmikroskopischen Versuche konnten Prognosen über Quartärstruktur und den Aufbau der Porenregion im Oligomer getroffen werden.

#### **4.3.1 Strukturanalysen mittels SDS-PAGE**

In einem ersten Schritt, sollte mithilfe eines Immunoblots der Gesamtmembranfraktion von ChR2-, BR- und HR-YFP exprimierenden Oozyten geklärt werden, ob Channelrhodopsin im Vergleich zu Bakteriorhodopsin und Halorhodopsin *in vivo* als Oligomer vorliegt und für diesen Fall, die Zahl der Untereinheiten bestimmt werden. Bei ChR2 waren Banden erkennbar, deren Laufhöhen auf eine monomere und dimere Form je nach Probenbehandlung hinwiesen. Die Tatsache, dass ausschließlich unter oxidierenden Bedingungen ein Dimer auftrat, das im Gegensatz zu BR und HR auch nach einer Behandlung mit dem ionischen Detergenz SDS erhalten blieb, spricht für die hohe Stabilität des ChR2-Dimerkomplexes. Während in einem BR- oder HR-Trimerkomplex die Interaktion der Untereinheiten zumeist durch hydrophobe Oberflächenkontakte vermittelt wird, müssen in einem ChR2-Dimer andere Wechselwirkungen existieren. Da die ChR2-Monomere nur nach einer Behandlung mit dem Reduktionsmittel DTT auftraten, lässt sich die Art dieser Wechselwirkungen auf starke Bindungskräfte wie intermolekulare

Wasserstoffbrücken, Disulfidbrücken oder ionische Bindungen eingrenzen. Dieses Ergebnis konnte durch die Kristallstruktur des Channelrhodopsins bestätigt werden. Diese zeigt, dass die Dimerisierung der Protomere unter anderem durch die Ausbildung von kovalenten Disulfidbrücken zwischen drei Cysteinresten im N-terminalen Bereich (C27, C73 und C75) und den entsprechenden Resten in ihrem Gegenstück vermittelt wird (Kato *et al.*, 2012).

Mit der hohen Stabilität der dimeren Form unterscheidet sich ChR2 deutlich von Bakterio- und Halorhodopsin. Diese liegen *in vivo* als Trimere vor, die funktionellen Einheiten stellen aber deren Monomere dar. Die hohe Stabilität der Quartärstruktur von ChR2 könnte darauf hindeuten, dass die Dimerisierung der Protomere für die Aktivität des Proteins zwingend notwendig ist. Dies würde bedeuten, dass bei Channelrhodopsinen das Dimer die funktionelle Einheit bildet.

### 4.3.2 Interaktionsanalysen über BIFC

Die in 3.3.1 beschriebenen biochemischen Versuche lieferten Hinweise auf eine dimere Quartärstruktur von Channelrhodopsin mit starken Wechselwirkungen der Untereinheiten. Die Voraussetzungen für die Bildung dieser Dimere wurden mittels der bi-molekularen Fluoreszenzkomplementation ausführlich untersucht. Anhand der in 3.3.2 dargestellten fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen konnte gezeigt werden, dass sowohl ChR2-Wildtyp Einheiten untereinander, als auch ChR2-Wildtyp und mutierte Untereinheiten interagieren können. Durch Kontrollexperimente mit zytosolischem YFP<sup>C</sup> und anderen Membranproteinen konnte sichergestellt werden, dass die Interaktion spezifisch war und nicht durch die fusionierten YFP-Fragmente oder Aggregation von Proteinen in der Membran aufgezwungen wurde. Bereits in den biochemischen Experimenten traten Hinweise auf unterschiedliche Bindungskräfte in Bakteriorhodopsin und Channelrhodopsin auf. Die Tatsache, dass in Oozyten, die BR-YFP<sup>N</sup> und ChR2-YFP<sup>C</sup> koexprimierten, keine Interaktion zu erkennen war, ist ein weiteres Indiz für diese Hypothese.

Aufgrund der Homologie von ChR1 und ChR2, insbesondere im Bereich der TM 3 und 4, und den nahezu identischen Effekten von Mutationen der in dieser Arbeit beschriebenen Aminosäuren auf die Expression von ChR1 und ChR2 wurde getestet ob eine Interaktion auf die Bildung von ChR2-Homodimeren beschränkt war oder ob auch Heterodimere aus ChR1 und ChR2 möglich waren. Interessanterweise konnte auch eine Interaktion von ChR1- und ChR2-Untereinheiten nachgewiesen werden. Eine Bildung von Heterodimeren aus ChR1 und ChR2 *in vivo* ist bisher noch nicht beschrieben worden und deren biologische Bedeutung in *C. reinhardtii* muss in weiteren Experimenten untersucht werden. Es wäre denkbar, dass die Zusammensetzung der Channelrhodopsin-Dimere im Organismus gezielt durch Variation der Proteinmengen von ChR1 und ChR2 beeinflusst wird. Die entstehenden Kanäle würden sich in den physikalischen Eigenschaften wie etwa Lichtempfindlichkeit, Stromamplitude und maximaler Anregungswellenlänge unterscheiden und es *C. reinhardtii* ermöglichen sich langfristig an geänderte Umweltbedingungen anzupassen.

#### **4.3.3 Interaktionsanalysen über DEVC**

Die Ergebnisse der in 3.3.1 beschriebenen Experimente bezüglich der dimeren Konformation von ChR1 und ChR2 konnten durch die Strukturmodelle von Muller *et al.* (2011) und Kato *et al.* (2012) bestätigt werden. Ausgehend von der Hypothese, dass die funktionelle Einheit in Channelrhodopsinen das Dimer ist, wurde untersucht ob sich die Protomere gegenseitig beeinflussen. Hierfür wurde die Stromantwort bei der Expression äquimolarer Mengen zweier klar unterscheidbarer ChR2-Varianten aufgezeichnet und auf ihre Kinetik hin untersucht.

Bei kurzen Anregungspulsen (5 ns) konnte ein biphasischer Schließvorgang beobachtet werden, dessen Schließzeitkonstanten identisch zu denen, der eingesetzten Channelrhodopsin-Typen waren. Dies ist ein Indiz dafür, dass die Protomere bei einer ausreichend kurzen Belichtung unabhängig aktiviert werden können. Zusätzlich kann davon ausgegangen werden, dass bei der Anregung einer einzelnen Untereinheit in einem Channelrhodopsin-Dimer der Einfluss der zweiten Untereinheit nur eine geringe Rolle spielt.

Wurde die Anregungszeit verlängert, konnten bei gleichen Injektionsmengen drei Schließzeiten beobachtet werden, von denen wiederum zwei den Schließzeiten der eingesetzten ChR2-Varianten entsprachen. Interessanterweise lag der Wert der dritten Schließzeit zwischen beiden Zeitkonstanten, und ließ sich keiner der in dieser Arbeit untersuchten ChR2-Varianten zuordnen. Mit einem Modell, in dem die Untereinheiten des Dimers unabhängig agieren können, kann das Auftreten einer dritten Schließzeit nicht erklärt werden. Findet allerdings eine Beeinflussung der Protomere untereinander statt, könnte die dritte Schließzeit der eines heterodimeren Kanals aus Wildtyp- und mutiertem ChR2 entsprechen. Eine Voraussetzung für die Bildung solcher Hybridkanäle ist die Interaktion unterschiedlicher ChR2-Varianten, was bereits mit den in 3.3.2 beschriebenen BIFC-Experimenten nachgewiesen wurde. Unter Berücksichtigung der kinetischen Unterschiede von wildtypischem und mutiertem ChR2 könnte die gegenseitige Beeinflussung in einem ChR2-Heterodimer auf sterische Effekte bei asynchronen Konformationsänderungen der Untereinheiten zurückzuführen sein. Ausgehend davon, dass diese sterischen Effekte nur bei einer simultanen Anregung der Protomere Auswirkungen haben, würde ein solches Modell auch nicht im Gegensatz zu den in 0 gezeigten Messungen mit einer kurzen Belichtungszeit stehen, da bei diesen möglicherweise nur eine Untereinheit angeregt wird.

Wegen der unterschiedlichen Lichtempfindlichkeiten von ChR2-WT und -Mutanten stellt eine Belichtung mit verschiedenen Lichtintensitäten eine weitere Möglichkeit dar, die Untereinheiten eines Heterodimers aus Wildtyp und langsam schließenden ChR2-Mutanten gezielt zu aktivieren. Hierfür wurde ChR2-WT und -C128T in einem Verhältnis von 3 zu1 und umgekehrt in Oozyten exprimiert und die Zeitkonstante des langsam schließenden Stromanteils bei abnehmender Lichtintensität bestimmt. Der deutliche Unterschied der Schließzeiten bei einer hohen Lichtintensität ist ein weiteres Indiz für die gegenseitige Beeinflussung der ChR2-Untereinheiten. Ohne diese sollten die Zeitkonstanten des langsam schließenden Stromanteils unabhängig des injizierten Verhältnisses identisch sein, was bei einer Verringerung der Lichtintensität auch eintritt. Eine Erklärung hierfür wäre, dass bei einer niedrigen Lichtintensität hauptsächlich ChR2-C128T Untereinheiten

angeregt werden und eine gegenseitige Beeinflussung, wie oben beschrieben, nur bei der gleichzeitigen Anregung beider Untereinheiten stattfindet.

#### 4.3.4 Quartärstruktur

In den bisher beschriebenen Experimenten wurde die Struktur von Channelrhodopsinen ausschließlich über die kinetischen Veränderungen bei der Koexpression zweier ChR2 Varianten untersucht. Auffällig bei diesen Versuchen war, dass trotz äquimolarer Verhältnisse von ChR2-WT und langsam schließender Mutante keine 50%ige Aufteilung des Gesamtstroms in schnell- und langsam schließenden Strom auftrat, was bei unabhängig operierenden Untereinheiten zu erwarten gewesen wäre. Daher wurde die Interaktion der Untereinheiten in ChR2-Heterodimeren auch quantitativ, über die Aufteilung der Stromverläufe bei Koexpression von ChR2-WT und -D156A in verschiedenen Verhältnissen untersucht. In einem ersten Schritt konnte durch getrennte und gemeinsame Expression gleicher Mengen beider Varianten gezeigt werden, dass die Summe der einzelnen Stromamplituden dem Gesamtstrom bei der Koexpression entspricht. Somit wurde sichergestellt, dass beide ChR2-Varianten in gleichen Verhältnissen zum Gesamtstrom beitragen, was für diesen Ansatz notwendig war.

**Tab. 4.1:** Gegenüberstellung der statistisch zu erwartenden Aufteilung von schnell und langsam schließenden Stromanteilen am Gesamtstrom bei Dimeren, in denen eine zusätzliche Stromkomponente mit eigener Schließzeit durch gegenseitige Beeinflussung der Protomere auftritt und bei unabhängig voneinander operierenden Untereinheiten. Die für die Ergebnisse relevanten Werte sind fett gedruckt.

abhängig				unabhängig			
Verhältnis	<b>wt/wt</b>	mut/mut	wt/mut	Verhältnis	<b>wt/wt</b>	mut/mut	wt/mut
1 + 1	<b>25 %</b>	25 %	50 %	1 + 1	<b>50 %</b>	50 %	-
3 + 1	<b>56 %</b>	6 %	38 %	3 + 1	<b>75 %</b>	25 %	-
1 + 3	<b>6 %</b>	56 %	38 %	1 + 3	<b>25 %</b>	75 %	-

Bei einer Expression der Channelrhodopsine in unterschiedlichen Mengenverhältnissen, stimmt die Verteilung des schnell und langsam schließenden Stromanteils gut mit den

Anteilen überein, die bei Bildung einer dritten, hybriden Stromkomponente mit eigener Schließzeit, durch gegenseitige Beeinflussung der Protomere zu erwarten sind. Dieses Ergebnis ist daher nicht nur ein weiteres Indiz für die dimere Quartärstruktur der Channelrhodopsine, sondern auch für die Bildung von Heterodimeren mit eigenen kinetischen Parametern.

## 5. Zusammenfassung

Die zur Gruppe der mikrobiellen Rhodopsine gehörenden lichtaktivierbaren Ionenkanäle Channelrhodopsin 1 (ChR1) und Channelrhodopsin 2 (ChR2) aus dem Augenfleck von *C. reinhardtii* sind Bestandteile des visuellen Systems und an der Phototaxis beteiligt. Sie bestehen aus einem zytosolisch gelegenen C-Terminus, dessen Funktion noch ungeklärt ist und einem, für die Kanalaktivität verantwortlichen, N-terminalen Bereich aus sieben Transmembranhelices. Der lichtensitive Kofaktor all-*trans*-Retinal ist kovalent an einen Lysinrest (K257) der siebten Transmembranhelix gebunden. Bei einer Belichtung mit Blaulicht isomerisiert das Chromophor zur 13-*cis* Form, was eine Konformationsänderung und das Öffnen des Kanals zur Folge hat. Im Zuge dessen strömen ein- und zweiwertige Kationen in die Zelle und eine Depolarisation findet statt. Um einen tieferen Einblick in Struktur und funktionelle Mechanismen zu bekommen, wurden Wildtyp und Mutanten von Ch1 und ChR2 heterolog in Oozyten von *X. laevis* exprimiert.

In Bakteriorhodopsin bilden die Seitenketten von T90 und D115 eine für Stabilität und Funktion wichtige Wasserstoffbrücke aus. Durch elektrophysiologische, fluoreszenzmikroskopische und biochemische Verfahren wurden Mutanten der entsprechenden Reste in ChR2 (C128, D156) untersucht. Diese zeigten eine deutlich verlangsamte Kinetik und eine 10- bis 100fache Erhöhung der Lichtempfindlichkeit. Die identischen Auswirkungen von Mutationen beider Reste deuten auf eine Bindung mit funktioneller Bedeutung zwischen C128 und D156 hin.

Im Falle von ChR2-C128T, -C128A und -D156A konnte der Kanal nach Anregung mit Blaulicht, durch grünes und violette Licht vorzeitig geschlossen werden. Diese Lichtqualitäten entsprechen den Absorptionswellenlängen zweier Intermediate des Photozyklus von ChR2 (P390 und P520). Durch Veränderung des externen pH-Wertes konnten Hinweise auf eine protonenabhängige Gleichgewichtsreaktion dieser Intermediate gefunden werden.

Auch in dem für Protonen höher leitfähigen ChR1 konnten Hinweise auf eine Interaktion zwischen den Resten C167 und D195 gefunden werden. Elektrische Messungen von

Mutanten zeigten eine deutliche Erhöhung des Photostroms bei verhältnismäßig geringem Anstieg der Schließzeit. Der Einfluss dieser Mutationen auf die Kinetik war somit weniger ausgeprägt als bei ChR2.

Einen besonderen Stellenwert unter allen Channelrhodopsin-Mutanten nehmen ChR2-D156C und ChR1-D195C ein. Mit einem Photostrom von 5  $\mu$ A bei ChR1-D195C und bis zu 50  $\mu$ A bei ChR2-D156C konnten für diese die höchsten Photoströme aller bisher charakterisierten ChR1- bzw. ChR2-Varianten nachgewiesen werden.

Durch fluoreszenzmikroskopische Quantifizierung konnte für alle im Rahmen dieser Arbeit erstellten ChR1- und ChR2-Mutanten eine erhöhte Proteinmenge sowohl in Anwesenheit als auch Abwesenheit zusätzlichen *all-trans*-Retinals während der Inkubation nachgewiesen werden. Die Fluoreszenzintensitäten korrelierten hierbei mit der Höhe der Stromamplituden und erreichten ein Maximum bei ChR2-D156C.

Biochemische Experimente mit der Gesamtmembranfraktion von ChR2 exprimierenden Oozyten lieferten Hinweise auf eine dimere Quartärstruktur von Channelrhodopsinen, was durch die Kristallstruktur einer Chimäre aus ChR1 und ChR2 von (Kato *et al.*, 2012) bestätigt wurde. Unter der Annahme, dass die Poren in den Proteomeren gebildet werden, konnte eine gegenseitige Beeinflussung der Regionen in heterodimeren Kanälen aus ChR2-Wildtyp und Mutanten aufgrund kinetischer Unterschiede bei kurzer und langer Belichtung oder der Verwendung von unterschiedlichen Lichtintensitäten nachgewiesen werden. Eine Voraussetzung für diesen Effekt ist eine synchrone Anregung beider Untereinheiten.

Die Interaktion von Channelrhodopsin-Untereinheiten konnte *in vivo* mithilfe der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich, dass die Wechselwirkung nicht nur auf identische Untereinheiten in Homodimeren beschränkt ist, sondern auch bei Heterodimeren aus verschiedenen ChR2-Untereinheiten und sogar zwischen ChR2 und ChR1 möglich ist.

## 6. Summary

The microbial type rhodopsins Channelrhodopsin 1 (ChR1) and Channelrhodopsin 2 (ChR2) are located in the eyespot of the green algae *Chlamydomonas reinhardtii*. They are light activated cation channels and play an important role in phototaxis. They are comprised of a cytosolic C-terminal part of unknown function and a transmembrane N-terminal part responsible for channel activity. The latter consists of seven transmembrane helices and the chromophore all-*trans*-Retinal, which is bound covalently as a Schiff base to a lysine residue. When activated with blue light, the chromophore isomerizes to the 13-*cis* state, followed by a conformational change of the protein and opening of the channel. The resulting influx of mono- and divalent cations leads to a depolarization of the cell. To get a deeper insight in structure and function of ChR1 and ChR2, wildtype and mutants have been heterologously expressed in oocytes of *Xenopus laevis*.

In bacteriorhodopsin, a hydrogen bond between the amino acids T90 and D115 is vital for protein stability and proper pump function. Mutants of the corresponding amino acids in ChR2 (C128, D156) were generated and analyzed electrophysiologically. They displayed a significant deceleration of closing time and a 10-100fold increase in light sensitivity. The identical impact of these mutations on kinetics suggests an interaction between these residues, probably also by the formation of a hydrogen bond.

In the case of ChR2-C128T, -C128A and -D156A closing could be accelerated via green and violet light application. These wavelengths correspond to the absorption wavelengths of the photointermediates P390 and P520 in the photocycle of ChR2. Furthermore, a possible proton-dependent equilibrium between these intermediates was identified by varying external proton concentrations.

Electrophysiological analyses of C167 and D195 mutants in ChR1 hinted towards an interaction similar to the one between the homologous residues C128 and D156 in ChR2. Both, ChR1-C167 and ChR1-D195 displayed increased current amplitudes, accompanied

by only a small increase in closing time. The impact of these mutations on channel kinetics was less pronounced than in ChR2.

The mutants ChR2-D156C and ChR1-D195C are of particular importance. Photocurrent amplitudes of 5  $\mu$ A for ChR1 and 50  $\mu$ A for ChR2 at -100 mV render these mutants the ones with the highest current amplitudes of all channelrhodopsin variants characterized up till now.

In comparison to wildtype channelrhodopsins, quantification by fluorescence microscopy revealed an increased protein amount in oocytes expressing ChR1 and ChR2 mutants, both in absence and presence of additional all-*trans*-Retinal during incubation. The fluorescence intensities correlated to the increased photocurrent amplitudes, reaching a maximum in the ChR2-D156C mutant.

Immunoblot experiments with total membrane fractions of oocytes expressing ChR2, bacteriorhodopsin and halorhodopsin hinted towards a dimeric quaternary structure of the channel. This has been confirmed by the recently published crystal structure of a chimaeric ChR1/ChR2 protein (Kato *et al.*, 2012). Assuming the pore in a channel dimer is formed by the protomers, interference or crosstalk between the subunits has been identified. Oocytes expressing mixtures of channelrhodopsins demonstrated differences in kinetics when illumination length and light intensity was varied. A prerequisite for this effect is a simultaneous excitation of both subunits.

The interaction of channelrhodopsin-subunits *in vivo* has been demonstrated by bimolecular fluorescence complementation assays. It was shown, that oligomerization is not restricted to identical subunits in a homodimer but also possible between different ChR2 variants in a heterodimer and even between ChR1 and ChR2.



## Literaturverzeichnis

- Adamian L, Liang J** (2002) Interhelical hydrogen bonds and spatial motifs in membrane proteins: Polar clamps and serine zippers. *Proteins-Structure Function and Genetics* **47**: 209-218
- Azuma M, Irie T, Seki T** (1993) Retinals and Retinols Induced by Estrogen in the Blood-Plasma of *Xenopus-Laevis*. *Journal of Experimental Biology* **178**: 89-96
- Baker DA** (1978) Proton Co-Transport of Organic Solutes by Plant-Cells. *New Phytologist* **81**: 485-497
- Bamann C, Gueta R, Kleinlogel S, Nagel G, Bamberg E** (2010) Structural guidance of the photocycle of channelrhodopsin-2 by an interhelical hydrogen bond. *Biochemistry* **49**: 267-278
- Bamann C, Kirsch T, Nagel G, Bamberg E** (2008) Spectral characteristics of the photocycle of channelrhodopsin-2 and its implication for channel function. *J Mol Biol* **375**: 686-694
- Berndt A, Prigge M, Gradmann D, Hegemann P** (2010) Two open states with progressive proton selectivities in the branched channelrhodopsin-2 photocycle. *Biophys J* **98**: 753-761
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 7595-7600
- Berndt A, Yizhar O, Gunaydin LA, Deisseroth K, Hegemann P** (2009) Bi-stable neural state switches. *Nat Neurosci* **12**: 229-234
- Berthold P, Tsunoda SP, Ernst OP, Mages W, Gradmann D, Hegemann P** (2008) Channelrhodopsin-1 initiates phototaxis and photophobic responses in *Chlamydomonas* by immediate light-induced depolarization. *Plant Cell* **20**: 1665-1677
- Bi A, Cui J, Ma YP, Olshevskaya E, Pu M, Dizhoor AM, Pan ZH** (2006) Ectopic expression of a microbial-type rhodopsin restores visual responses in mice with photoreceptor degeneration. *Neuron* **50**: 23-33
- Bissonnette P, Leduc-Nadeau A, Lahjouji K, Lapointe JY, Bichet DG** (2007) Elaboration of a novel technique for purification of plasma membranes from *Xenopus laevis* oocytes. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **292**: C1132-C1136

- Boyden ES, Zhang F, Bamberg E, Nagel G, Deisseroth K** (2005) Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat Neurosci* **8**: 1263-1268
- Bruegmann T, Malan D, Hesse M, Beiert T, Fuegemann CJ, Fleischmann BK, Sasse P** (2010) Optogenetic control of heart muscle in vitro and in vivo. *Nat Methods* **7**: 897-900
- Bruun S, Naumann H, Kuhlmann U, Schulz C, Stehfest K, Hegemann P, Hildebrandt P** (2011) The chromophore structure of the long-lived intermediate of the C128T channelrhodopsin-2 variant. *FEBS Lett* **585**: 3998-4001
- Dencher NA, Heyn MP** (1979) Bacteriorhodopsin monomers pump protons. *FEBS Lett* **108**: 307-310
- Douglass AD, Kraves S, Deisseroth K, Schier AF, Engert F** (2008) Escape behavior elicited by single, channelrhodopsin-2-evoked spikes in zebrafish somatosensory neurons. *Curr Biol* **18**: 1133-1137
- Ernst OP, Sanchez Murcia PA, Daldrop P, Tsunoda SP, Kateriya S, Hegemann P** (2008) Photoactivation of channelrhodopsin. *J Biol Chem* **283**: 1637-1643
- Essen L, Siegert R, Lehmann WD, Oesterhelt D** (1998) Lipid patches in membrane protein oligomers: crystal structure of the bacteriorhodopsin-lipid complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 11673-11678
- Essen LO, Siegert R, Lehmann WD, Oesterhelt D** (1998) Lipid patches in membrane protein oligomers: Crystal structure of the bacteriorhodopsin-lipid complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 11673-11678
- Faham S, Yang D, Bare E, Yohannan S, Whitelegge JP, Bowie JU** (2004) Side-chain contributions to membrane protein structure and stability. *J Mol Biol* **335**: 297-305
- Feldbauer K, Zimmermann D, Pintschovius V, Spitz J, Bamann C, Bamberg E** (2009) Channelrhodopsin-2 is a leaky proton pump. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 12317-12322
- Geu-Flores F, Nour-Eldin HH, Nielsen MT, Halkier BA** (2007) USER fusion: a rapid and efficient method for simultaneous fusion and cloning of multiple PCR products. *Nucleic Acids Research* **35**: e55
- Govorunova EG, Jung KH, Sineshchekov OA, Spudich JL** (2004) Chlamydomonas sensory Rhodopsins A and B: Cellular content and role in photophobic responses. *Biophys J* **86**: 2342-2349
- Gradinaru V, Mogri M, Thompson KR, Henderson JM, Deisseroth K** (2009) Optical deconstruction of parkinsonian neural circuitry. *Science* **324**: 354-359

- Grigorieff N, Ceska TA, Downing KH, Baldwin JM, Henderson R** (1996) Electron-crystallographic refinement of the structure of bacteriorhodopsin. *J Mol Biol* **259**: 393-421
- Grossman AR** (2005) Paths toward algal genomics. *Plant Physiol* **137**: 410-427
- Grossman AR** (2007) In the grip of algal genomics. *Transgenic Microalgae as Green Cell Factories* **616**: 54-76
- Hagglund M, Borgius L, Dougherty KJ, Kiehn O** (2010) Activation of groups of excitatory neurons in the mammalian spinal cord or hindbrain evokes locomotion. *Nat Neurosci* **13**: 246-252
- Harper JDI** (1999) Chlamydomonas cell cycle mutants. *International Review of Cytology - a Survey of Cell Biology, Vol 189* **189**: 131-176
- Haupts U, Tittor J, Oesterhelt D** (1999) Closing in on bacteriorhodopsin: progress in understanding the molecule. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **28**: 367-399
- Hoff WD, Jung KH, Spudich JL** (1997) Molecular mechanism of photosignaling by archaeal sensory rhodopsins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **26**: 223-258
- Juel C** (1996) Lactate/proton co-transport in skeletal muscle: regulation and importance for pH homeostasis. *Acta Physiologica Scandinavica* **156**: 369-374
- Kateriya S, Nagel G, Bamberg E, Hegemann P** (2004) "Vision" in single-celled algae. *News Physiol Sci* **19**: 133-137
- Kato HE, Zhang F, Yizhar O, Ramakrishnan C, Nishizawa T, Hirata K, . . . Nureki O** (2012) Crystal structure of the channelrhodopsin light-gated cation channel. *Nature*
- Kerppola TK** (2009) Visualization of molecular interactions using bimolecular fluorescence complementation analysis: characteristics of protein fragment complementation. *Chem Soc Rev* **38**: 2876-2886
- Kimura Y, Vassilyev DG, Miyazawa A, Kidera A, Matsushima M, Mitsuoka K, . . . Fujiyoshi Y** (1997) Surface of bacteriorhodopsin revealed by high-resolution electron crystallography. *Nature* **389**: 206-211
- Kleinlogel S, Feldbauer K, Dempski RE, Fotis H, Wood PG, Bamann C, Bamberg E** (2011) Ultra light-sensitive and fast neuronal activation with the Ca<sup>2+</sup>-permeable channelrhodopsin CatCh. *Nat Neurosci* **14**: 513-518
- Kramer RH, Fortin DL, Trauner D** (2009) New photochemical tools for controlling neuronal activity. *Curr Opin Neurobiol* **19**: 544-552

- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Lagali PS, Balya D, Awatramani GB, Munch TA, Kim DS, Busskamp V, . . . Roska B** (2008) Light-activated channels targeted to ON bipolar cells restore visual function in retinal degeneration. *Nat Neurosci* **11**: 667-675
- Lanyi JK** (1999) Bacteriorhodopsin. *Int Rev Cytol* **187**: 161-202
- Lanyi JK, Schobert B** (2003) Mechanism of proton transport in bacteriorhodopsin from crystallographic structures of the K, L, M-1, M-2, and M-2' intermediates of the photocycle. *J Mol Biol* **328**: 439-450
- Lee JH, Durand R, Gradinaru V, Zhang F, Goshen I, Kim DS, . . . Deisseroth K** (2010) Global and local fMRI signals driven by neurons defined optogenetically by type and wiring. *Nature* **465**: 788-792
- Li X, Gutierrez DV, Hanson MG, Han J, Mark MD, Chiel H, . . . Herlitze S** (2005) Fast noninvasive activation and inhibition of neural and network activity by vertebrate rhodopsin and green algae channelrhodopsin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 17816-17821
- Lin JY** (2011) A user's guide to channelrhodopsin variants: features, limitations and future developments. *Exp Physiol* **96**: 19-25
- Lin JY, Lin MZ, Steinbach P, Tsien RY** (2009) Characterization of engineered channelrhodopsin variants with improved properties and kinetics. *Biophys J* **96**: 1803-1814
- Llewellyn ME, Thompson KR, Deisseroth K, Delp SL** (2010) Orderly recruitment of motor units under optical control in vivo. *Nat Med* **16**: 1161-1165
- Ludmann K, Ganea C, Varo G** (1999) Back photoreaction from intermediate M of bacteriorhodopsin photocycle. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology* **49**: 23-28
- Luecke H, Richter HT, Lanyi JK** (1998) Proton transfer pathways in bacteriorhodopsin at 2.3 Angstrom resolution. *Science* **280**: 1934-1937
- Luecke H, Schobert B, Lanyi JK, Spudich EN, Spudich JL** (2001) Crystal structure of sensory rhodopsin II at 2.4 angstroms: insights into color tuning and transducer interaction. *Science* **293**: 1499-1503
- Luecke H, Schobert B, Richter HT, Cartailier JP, Lanyi JK** (1999) Structure of bacteriorhodopsin at 1.55 angstrom resolution. *J Mol Biol* **291**: 899-911

- Man D, Wang W, Sabeji G, Aravind L, Post AF, Massana R, . . . Beja O** (2003) Diversification and spectral tuning in marine proteorhodopsins. *EMBO J* **22**: 1725-1731
- Merchant SS, Prochnik SE, Vallon O, Harris EH, Karpowicz SJ, Witman GB, . . . Team JA** (2007) The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science* **318**: 245-251
- Mitsuoka K, Hirai T, Murata K, Miyazawa A, Kidera A, Kimura Y, Fujiyoshi Y** (1999) The structure of bacteriorhodopsin at 3.0 angstrom resolution based on electron crystallography: Implication of the charge distribution. *J Mol Biol* **286**: 861-882
- Muller M, Bamann C, Bamberg E, Kuhlbrandt W** (2011) Projection Structure of Channelrhodopsin-2 at 6 Å Resolution by Electron Crystallography. *J Mol Biol*
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H** (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**: 263-273
- Nack M, Radu I, Gossing M, Bamann C, Bamberg E, von Mollard GF, Heberle J** (2010) The DC gate in Channelrhodopsin-2: crucial hydrogen bonding interaction between C128 and D156. *Photochem Photobiol Sci* **9**: 194-198
- Nagel G, Barbry P, Chabot H, Brochiero E, Hartung K, Grygorczyk R** (2005) CFTR fails to inhibit the epithelial sodium channel ENaC expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *J Physiol* **564**: 671-682
- 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. *Curr Biol* **15**: 2279-2284
- Nagel G, Ollig D, Fuhrmann M, Kateriya S, Mustl AM, Bamberg E, Hegemann P** (2002) Channelrhodopsin-1: A light-gated proton channel in green algae. *Science* **296**: 2395-2398
- Nagel G, Szellas T, Huhn W, Kateriya S, Adeishvili N, Berthold P, . . . Bamberg E** (2003) Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 13940-13945
- Nikolic K, Grossman N, Grubb MS, Burrone J, Toumazou C, Degenaar P** (2009) Photocycles of Channelrhodopsin-2. *Photochem Photobiol* **85**: 400-411
- Nour-Eldin HH, Geu-Flores F, Halkier BA** (2010) USER cloning and USER fusion: the ideal cloning techniques for small and big laboratories. *Methods Mol Biol* **643**: 185-200

- Oesterhelt D** (1998) The structure and mechanism of the family of retinal proteins from halophilic archaea. *Curr Opin Struct Biol* **8**: 489-500
- Oesterhelt D, Hess B** (1973) Reversible photolysis of the purple complex in the purple membrane of *Halobacterium halobium*. *European Journal of Biochemistry* **37**: 316-326
- Ohno K, Govindjee R, Ebrey TG** (1983) Blue-Light Effect on Proton Pumping by Bacteriorhodopsin. *Biophys J* **43**: 251-254
- Okada T, Sugihara M, Bondar AN, Elstner M, Entel P, Buss V** (2004) The retinal conformation and its environment in rhodopsin in light of a new 2.2 angstrom crystal structure. *J Mol Biol* **342**: 571-583
- Paddock SW** (2000) Principles and practices of laser scanning confocal microscopy. *Mol Biotechnol* **16**: 127-149
- Patzelt H, Simon B, terLaak A, Kessler B, Kuhne R, Schmieder P, . . . Oschkinat H** (2002) The structures of the active center in dark-adapted bacteriorhodopsin by solution-state NMR spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 9765-9770
- PebayPeyroula E, Rummel G, Rosenbusch JP, Landau EM** (1997) X-ray structure of bacteriorhodopsin at 2.5 angstroms from microcrystals grown in lipidic cubic phases. *Science* **277**: 1676-1681
- Peralvarez-Marin A, Marquez M, Bourdelande JL, Querol E, Padros E** (2004) Thr-90 plays a vital role in the structure and function of bacteriorhodopsin. *J Biol Chem* **279**: 16403-16409
- Peralvarez A, Barnadas R, Sabes M, Querol E, Padros E** (2001) Thr90 is a key residue of the bacteriorhodopsin proton pumping mechanism. *FEBS Lett* **508**: 399-402
- Popot JL, Engelman DM** (2000) Helical membrane protein folding, stability, and evolution. *Annual Review of Biochemistry* **69**: 881-922
- Rein ML, Deussing JM** (2012) The optogenetic (r)evolution. *Mol Genet Genomics* **287**: 95-109
- Ritter E, Stehfest K, Berndt A, Hegemann P, Bartl FJ** (2008) Monitoring light-induced structural changes of Channelrhodopsin-2 by UV-visible and Fourier transform infrared spectroscopy. *J Biol Chem* **283**: 35033-35041
- Royant A, Edman K, Ursby T, Pebay-Peyroula E, Landau EM, Neutze R** (2000) Helix deformation is coupled to vectorial proton transport in the photocycle of bacteriorhodopsin. *Nature* **406**: 645-648

- Sineshchekov OA, Jung KH, Spudich JL** (2002) Two rhodopsins mediate phototaxis to low- and high-intensity light in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 8689-8694
- Spudich JL** (1998) Variations on a molecular switch: transport and sensory signalling by archaeal rhodopsins. *Mol Microbiol* **28**: 1051-1058
- Stehfest K, Hegemann P** (2010) Evolution of the Channelrhodopsin Photocycle Model. *Chemphyschem* **11**: 1120-1126
- Stehfest K, Ritter E, Berndt A, Bartl F, Hegemann P** (2010) The branched photocycle of the slow-cycling channelrhodopsin-2 mutant C128T. *J Mol Biol* **398**: 690-702
- Stoeckenius W, Lozier RH, Niederberger W** (1977) Photoreactions of bacteriorhodopsin. *Biophys Struct Mech* **3**: 65-68
- Suzuki T, Yamasaki K, Fujita S, Oda K, Iseki M, Yoshida K, . . . Takahashi T** (2003) Archaeal-type rhodopsins in *Chlamydomonas*: model structure and intracellular localization. *Biochem Biophys Res Commun* **301**: 711-717
- Takeda K, Sato H, Hino T, Kono M, Fukuda K, Sakurai I, . . . Kouyama T** (1998) A novel three-dimensional crystal of bacteriorhodopsin obtained by successive fusion of the vesicular assemblies. *J Mol Biol* **283**: 463-474
- Thurston CF, Perry CR, Pollard JW** (1988) Electrophoresis of RNA denatured with glyoxal or formaldehyde. *Methods Mol Biol* **4**: 1-11
- Tsai HC, 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**: 1080-1084
- Tsunoda SP, Hegemann P** (2009) Glu 87 of channelrhodopsin-1 causes pH-dependent color tuning and fast photocurrent inactivation. *Photochem Photobiol* **85**: 564-569
- Verhoefen MK, Bamann C, Blocher R, Forster U, Bamberg E, Wachtveitl J** (2010) The Photocycle of Channelrhodopsin-2: Ultrafast Reaction Dynamics and Subsequent Reaction Steps. *Chemphyschem* **11**: 3113-3122
- Wang H, Peca J, Matsuzaki M, Matsuzaki K, Noguchi J, Qiu L, . . . Augustine GJ** (2007) High-speed mapping of synaptic connectivity using photostimulation in Channelrhodopsin-2 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 8143-8148
- Wang J, Hasan MT, Seung HS** (2009) Laser-evoked synaptic transmission in cultured hippocampal neurons expressing channelrhodopsin-2 delivered by adeno-associated virus. *J Neurosci Methods* **183**: 165-175

- White SH** (2006) How hydrogen bonds shape membrane protein structure. *Peptide Solvation and H-Bonds* **72**: 157-+
- Yizhar O, Fenno L, Zhang F, Hegemann P, Diesseroth K** (2011) Microbial Opsins: A Family of Single-Component Tools for Optical Control of Neural Activity. *Cold Spring Harbor Protocols* **2011**: top102
- Zhang W, Ge W, Wang Z** (2007) A toolbox for light control of Drosophila behaviors through Channelrhodopsin 2-mediated photoactivation of targeted neurons. *Eur J Neurosci* **26**: 2405-2416
- Zhou C, Yang Y, Jong AY** (1990) Mini-prep in ten minutes. *Biotechniques* **8**: 172-173
- Zimmermann D, Zhou A, Kiesel M, Feldbauer K, Terpitz U, Haase W, . . . Sukhorukov VL** (2008) Effects on capacitance by overexpression of membrane proteins. *Biochem Biophys Res Commun* **369**: 1022-1026

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Schematische Darstellung von <i>Clamydomonas reinhardtii</i> .....	1
Abb. 1.2: Strukturmodelle von Bovinem Rhodopsin und Bakteriorhodopsin aus <i>Halobacterium salinarum</i> .....	3
Abb. 1.3: Photostrom von ChR2-WT und ChR1-WT.....	5
Abb. 1.4: Photozyklusmodelle von BR und ChR2 .....	6
Abb. 1.5: Kristallstruktur der ChR1/ChR2 Chimäre aus drei Blickwinkeln .....	9
Abb. 2.1: Schematischer Ablauf einer USER Klonierungsreaktion .....	23
Abb. 2.2: Schematische Darstellung eines konfokalen Laser Scanning Mikroskops.....	29
Abb. 2.3: Schematische Darstellung des BIFC-Verfahrens .....	31
Abb. 2.4: Schema einer TEVC-Messung an Oozyten .....	33
Abb. 3.1: Sequenzvergleich von ChR1 und ChR2 aus <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> , BR aus <i>Halobacterium salinarum</i> , Proteorhodopsin eines bisher nicht kultivierten Eubakteriums und Nop-1 aus <i>Neurospora crassa</i> .....	36
Abb. 3.2: Elektrische Messung lichtinduzierter Ströme von ChR2-WT und -Mutanten in Oozyten von <i>X. laevis</i> .....	38
Abb. 3.3: Elektrische Messung der Photoströme nach Belichtung mit kurzen Laserpulsen .....	39
Abb. 3.4: Bestimmung der Lichtsensitivität von ChR2-WT, ChR2-C128T und ChR2-C128A .....	40

Abb. 3.5: Inhibition von ChR2-C128A und -D156A bei Belichtung mit grünem und violettem Licht.....	42
Abb. 3.6: Inhibition und Aktivierung von ChR2-C128A mit grünem und violettem Licht. .....	43
Abb. 3.7: Fluoreszenz von ChR2-YFP Wildtyp und -Mutanten in Abhängigkeit von Retinal .....	44
Abb. 3.8: Elektrische Messung lichtinduzierter Ströme von ChR2-C128D, -D156C und -C128D/D156C in Oozyten von <i>X. laevis</i> .....	46
Abb. 3.9: Elektrische Messung lichtinduzierter Ströme von ChR1-WT und -Mutanten.	48
Abb. 3.10: Fluoreszenz von ChR1-WT::YFP und Mutanten in Oozyten von <i>X. laevis</i> .	50
Abb. 3.11: Photoströme von ChR1-WT, -C167T, -C167A, -D195C, -D195A und -D195C/C167T in Oozyten von <i>X. laevis</i> .....	51
Abb. 3.12: Photoströme und Fluoreszenz von ChR1-WT::YFP, ChR1-D195C::YFP, ChR2-WT::YFP und ChR2-D156C::YFP in Oozyten von <i>X. laevis</i> . .....	53
Abb. 3.13: Protein-Immunoblot von ChR2, Bakteriorhodopsin und Halorhodopsin.....	55
Abb. 3.14: Interaktion von Channelrhodopsin Wildtypformen und Mutanten in <i>X. laevis</i> Oozyten.....	57
Abb. 3.15: Stromantworten einzeln und koexprimierter ChR2 Varianten bei kurzer Belichtung in Oozyten von <i>X. laevis</i> . .....	58
Abb. 3.16: Elektrische Messungen bei Einzel- und Koexpression von ChR2 Varianten in Oozyten.....	60
Abb. 3.17: Schließzeiten des langsam schließenden Stromanteils bei Koexpression von ChR2-C128T und -WT in verschiedenen Verhältnissen.....	62

Abb. 3.18: Photoströme bei Koexpression von ChR2-WT und -D156A in verschiedenen Verhältnissen. ....	64
Abb. 4.1: Homologiemodell der Retinalbindetasche in ChR2 auf Basis der Kristallstruktur von SR II aus <i>Natronomonas pharaonis</i> .....	67
Abb. 4.2: Vergleich der Photozyklusmodelle von ChR2-C128T aus Stehfest <i>et al.</i> (2010) und Bamann <i>et al.</i> (2010).....	68
Abb. 4.3: Schematische Darstellung der Zyklusreaktionen und ihren zeitlichen Parametern bei ChR2-C128A im offenen und geschlossenen Zustand.....	70
Abb. 4.4: Kombination der Seitenreste von ChR2-C128 und ChR2-D156.....	73
Abb. 4.5: Strukturvergleich der Retinalbindetasche und der umgebenden Resten aus C1C2 und Bakteriorhodopsin.....	76

---

## Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: Ansatz einer PCR-Reaktion .....	16
Tab. 2.2: Ablauf einer PCR-Reaktion .....	16
Tab. 2.3: Ansatz eines Restriktionsverdau.....	17
Tab. 2.4: Zusammensetzung der Puffer für DNA- und RNA-Gelelektrophorese.....	18
Tab. 2.5: Zusammensetzung der DNA- und RNA-Probenpuffer .....	19
Tab. 2.6: Ansatz einer Ligationsreaktion .....	20
Tab. 2.7: Ansatz einer Mutagenese-Reaktion .....	20
Tab. 2.8: Ablauf einer PCR-basierten Mutagenesereaktion.....	21
Tab. 2.9: Ansatz einer <i>in vitro</i> Transkription .....	25
Tab. 2.10: Zusammensetzung des SDS-PAGE Probenpuffers.....	27
Tab. 3.1: Auflistung der kinetischen Parameter von ChR2-WT, -C128T, -C128A und -D156A .....	39
Tab. 3.2: Gegenüberstellung der Halblichtsättigungswerte und Schließzeiten von ChR2-WT, -C128T, -C128A und -D156A.....	41
Tab. 3.3: Zusammenstellung der Schließzeiten von ChR2-C128D, -D156C und -C128D/D156C.....	47
Tab. 3.4: Gegenüberstellung der Schließzeiten von ChR1-WT und -Mutanten und den $I_{\text{NMG}}/I_{\text{Na}}$ Quotienten in %. .....	52

Tab. 3.5: Gegenüberstellung der Schließzeiten bei Einzel- und Koexpression verschiedener ChR2 Varianten bei Belichtung für 5 ns .....	59
Tab. 3.6: Gegenüberstellung der Schließzeiten bei Einzel- und Koexpression verschiedener ChR2 Varianten bei 5 s Belichtung .....	60
Tab. 4.1: Gegenüberstellung der statistisch zu erwartenden Aufteilung von schnell und langsam schließenden Stromanteilen am Gesamtstrom.....	82

## Abkürzungsverzeichnis

bp	Basenpaare
BR	Bakteriorhodopsin
BSA	Bovine Serum Albumin
Chop1	Channelopsin-1
Chop2	Channelopsin-2
ChR1	Channelrhodopsin-1
ChR2	Channelrhodopsin-2
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DEVC	Double Electrode Voltage Clamp
<i>ddH<sub>2</sub>O</i>	Destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
fwd	Forward, in 5`-3`-Richtung
GFP	Green fluorescent Protein
HR	Halorhodopsin
IVT	<i>In vitro</i> Transkription
kDa	Kilodalton
$K_m$	Michaeliskonstante
LB	Lysogeny broth

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

LED	Light Emitting Diode
M	molar
NMG	N-Methyl-(D)-Glucamin
n. n.	nicht nachweisbar
ORi-	Oozyten Ringer-Lösung
PBST	Phosphatgepufferte Salzlösung mit Tween
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
rev	Reverse, in 3`-5`-Richtung
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBST	Tris gepufferte Salzlösung mit Tween
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TENS	Puffer aus Tris, EDTA, NaOH und SDS
TM	Transmembrandomäne
U	Unit
V	Volt
WT	Wildtyp
WT::YFP	Wildtyp mit N-terminal fusioniertem YFP voller Länge
WT::YFP <sup>C</sup>	Wildtyp mit N-terminal fusioniertem YFP (C-terminales Fragment)
WT::YFP <sup>N</sup>	Wildtyp mit N-terminal fusioniertem YFP (N-terminales Fragment)
YFP	Yellow fluorescent Protein

## Puffer und Lösungen

LB-Medium:	5 g Hefeextrakt, 10 g Trypton, 10 g NaCl, ddH <sub>2</sub> O ad 1 l
LB-Agar	5 g Hefeextrakt, 10 g Trypton, 10 g NaCl, 15 g Agar, ddH <sub>2</sub> O ad 1 l
1x PBST	137 mM NaCl, 12 mM Phosphate, 2,7 mM KCl, 0,1% Tween, pH 7,4
1x TBST	150 mM NaCl, 10 mM Tris, 0,1 % Tween, pH 7,5
ORi (BaCl <sub>2</sub> )	110 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM BaCl <sub>2</sub> , 1 mM MgCl <sub>2</sub> , 5 mM HEPES, pH 7,6 (mit NaOH eingestellt)
ND 96	96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM CaCl <sub>2</sub> , 1 mM MgCl <sub>2</sub> , 5 mM HEPES, pH 7,6 (mit NaOH eingestellt)
TE	10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8
TENS	10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8, 0,1 N NaOH, 0,5 % SDS
WB-Blotpuffer	25 mM Tris, pH 8,0-10,5; 192 mM Glycin, 20 % Methanol
WB-Laufpuffer	25 mM Tris, pH 8,3-8,8; 192 mM Glycin, 0,1 % SDS
WB-Transferp.	25 mM Tris, pH 8,0-10,5; 192 mM Glycin

## Nukleotidsequenzen

Die dargestellten cDNA- und Primer-Sequenzen sind in 5' → 3'-Richtung angegeben

### Channelrhodopsin 1 (ChR1), Aminosäuren 1-347

```

1  atgtcgcgga  ggccatggct  tcttgcccta  gcgctggcag  tggcgctggc
51  ggccggcagc  gcaggagcct  cgactggcag  tgacgcgacg  gtgccggtcg
101  cgactcagga  tggcccccgc  tacgttttcc  accgtgccc  cgagcgcgatg
151  ctcttccaaa  cctcatacac  tcttgagaac  aatggttctg  ttatttgcgat
201  cccgaacaac  ggccagtget  tctgcttggc  ttggcttaaa  tccaacggaa
251  caaatgccga  gaagtggct  gccaacattc  tgcagtggat  tacttttgcg
301  ctttcagcgc  tctgcctgat  gttctacggc  taccagacct  ggaagtctac
351  ttgcggtcgg  gaggagatth  acgtggccac  gatcgagatg  atcaagttca
401  tcatcgagta  tttccatgag  tttgacgaac  ctgcggtgat  ctactcatcc
451  aacggcaaca  agaccgtgtg  gcttcgttac  gcggagtggc  tgctgacctg
501  ccctgtcatt  cttatccatc  tgagcaacct  tacgggtctg  gcgaacgact
551  ataacaagcg  taccatgggt  ctgctgggtg  cagatctcgg  cacgatcgtg
601  tggggcacca  cggccgcgct  gtccaaggga  tacgtccgtg  tcattttctt
651  cctgatgggc  ctgtgctacg  gcatctacac  attcttcaac  gcagccaagg
700  tctacattga  ggcgtaccac  accgtgccc  agggcatttg  ccgcgacctg
751  gtccgctacc  ttgcctggct  ctacttctgt  tcatgggcta  tgttcccggg
801  gctgttctctg  ctgggccccg  agggctttgg  ccacatcaac  caattcaact
850  ctgccaatcgc  ccacgccatc  ctggaccttg  cctccaagaa  cgcttggagt
901  atgatgggtc  actttctgcg  tgtcaagatc  cacgagcaca  tcttctgtga
951  cggcgacatc  cgcaagaagc  agaaggtcaa  cgtggctggc  caggagatgg
1001  aggtggagac  catggtgcac  gaggaggacg  acgagacgca  gtaa

```

### Channelrhodopsin 2 (ChR1), Aminosäuren 1-315

```

1  atggattatg  gaggcgccct  gagtgccgtt  gggcgcgagc  tgctatttgt
51  aacgaacca  gtagtcgtca  atggctctgt  acttgtgctt  gaggaccagt
101  gttactgctc  gggctggatt  gagtgcgctg  gcacaaacgg  tgcccaaacg
151  gcgtcgaacg  tgctgcaatg  gcttctgctc  ggcttctcca  tcctactgct
201  tatgttttac  gcctaccaa  catggaagtc  aacctgcggc  tgggaggaga
251  tctatgtgtg  cgctatcgag  atggcaagg  tgattctcga  gttcttcttc
301  gagtttaaga  acccgtccat  gctgtatcta  gccacaggcc  acccgtcca
351  gtggttgctg  tacgccgagt  ggcttctcac  ctgcccggtc  attctcattc
401  acctgtcaaa  cctgacgggc  ttgtccaacg  actacagcag  gcgcaccatg
451  ggtctgcttg  tgtctgatat  tggcacaatt  gtgtggggcg  ccacttccgc
501  catggccacc  ggatacgtca  aggtcatctt  cttctgcctg  ggtctgtgtt
551  atggtgctaa  cacgttcttt  cacgctgcca  aggcctacat  cgagggttac
601  cacaccgtgc  cgaagggccg  gtgtcgccag  gtggtgactg  gcatggcttg

```

651 gctcttcttc gtatcatggg gtatgttccc catcctgttc atcctcggcc  
 700 ccgagggctt cggcgtcctg agcgtgtacg gctccaccgt cggccacacc  
 751 atcattgacc tgatgtcgaa gaactgctgg ggtctgctcg gccactacct  
 801 gcgctgtctg atccacgagc atatcctcat ccacggcgac attcgaaga  
 850 ccaccaaat gaacattggt ggcaactgaga ttgaggtcga gacgctggtg  
 901 gaggacgagg ccgaggctgg cgcggtcaac aagggcaccg gcaagtaa

**Bakteriorhodopsin (BR), *Halobacterium salinarum*, Aminosäuren 1-263**

1 atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt  
 51 cgagctggac ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg  
 101 gcgagggcga tgccacctac ggcaagctga ccctgaagct gatctgcacc  
 151 accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc ctctgtacca ccctgggcta  
 201 cggcctgcag tgcttcgccc gctaccccga ccacatgaag cagcacgact  
 251 tcttcaagtc cgccatgccc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc  
 301 ttcaaggacg acggcaacta caagaccgc gccgaggtga agttcgaggg  
 351 cgacaccctg gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg  
 401 acggcaacat cctggggcac aagctggagt acaactacaa cagccacaac  
 451 gtctatatca ccgccgacaa gcagaagaac ggcataaagg ccaacttcaa  
 501 gatccgccac aacatcgagg acggcggcgt gcagctcgcc gaccactacc  
 551 agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgetgctgcc cgacaaccac  
 601 tacctgagct accagtcgac cctgagcaaa gacccaacg agaagcgcga  
 651 tcacatggtc ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc actctcggca  
 700 tggacgagct gtacaagtaa

**Venus-YFP, Aminosäuren 1-239**

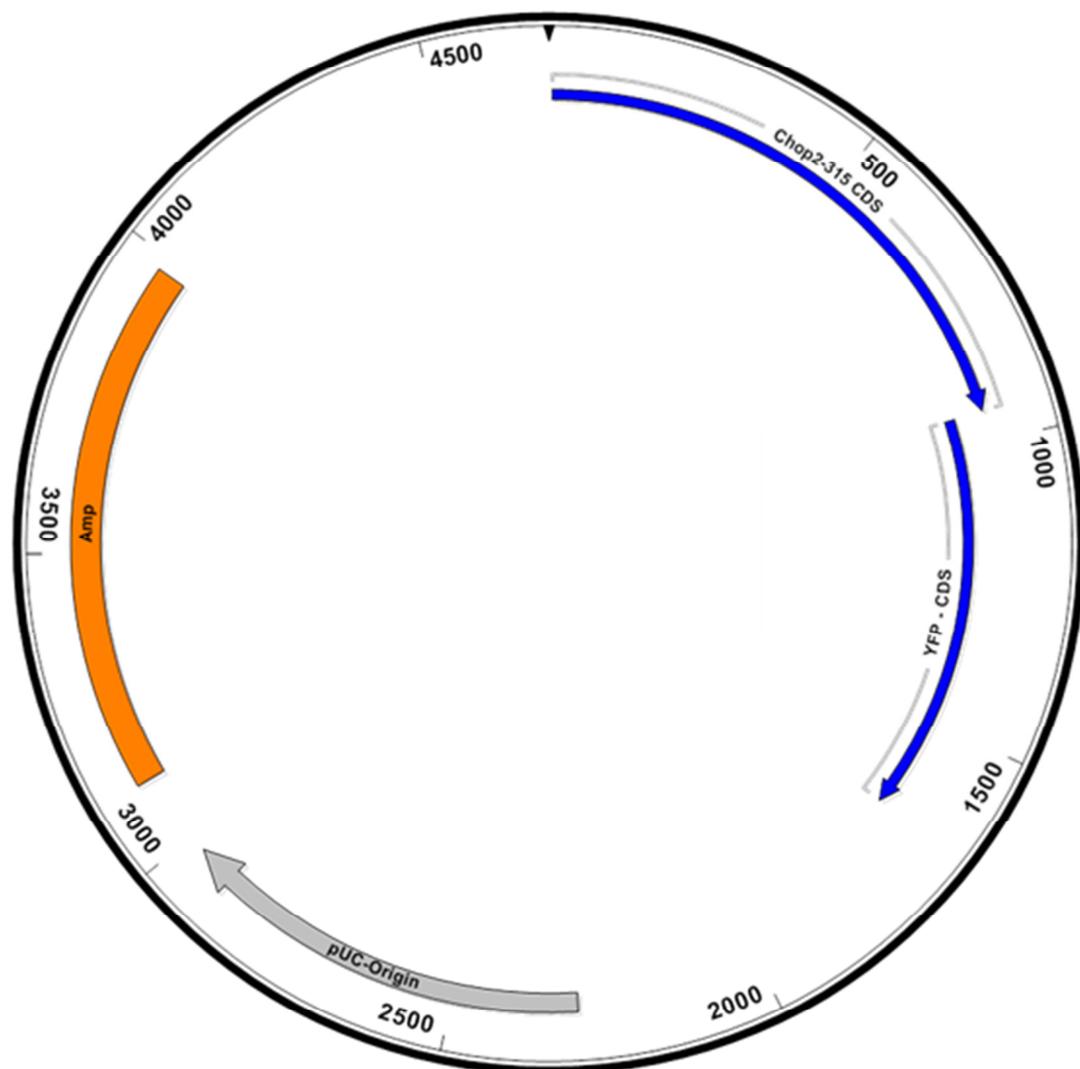
1 atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt  
 51 cgagctggac ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg  
 101 gcgagggcga tgccacctac ggcaagctga ccctgaagct gatctgcacc  
 151 accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc ctctgtacca ccctgggcta  
 201 cggcctgcag tgcttcgccc gctaccccga ccacatgaag cagcacgact  
 251 tcttcaagtc cgccatgccc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc  
 301 ttcaaggacg acggcaacta caagaccgc gccgaggtga agttcgaggg  
 351 cgacaccctg gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg  
 401 acggcaacat cctggggcac aagctggagt acaactacaa cagccacaac  
 451 gtctatatca ccgccgacaa gcagaagaac ggcataaagg ccaacttcaa  
 501 gatccgccac aacatcgagg acggcggcgt gcagctcgcc gaccactacc  
 551 agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgetgctgcc cgacaaccac  
 601 tacctgagct accagtcgac cctgagcaaa gacccaacg agaagcgcga  
 651 tcacatggtc ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc actctcggca  
 700 tggacgagct gtacaagtaa

**Primersequenzen**

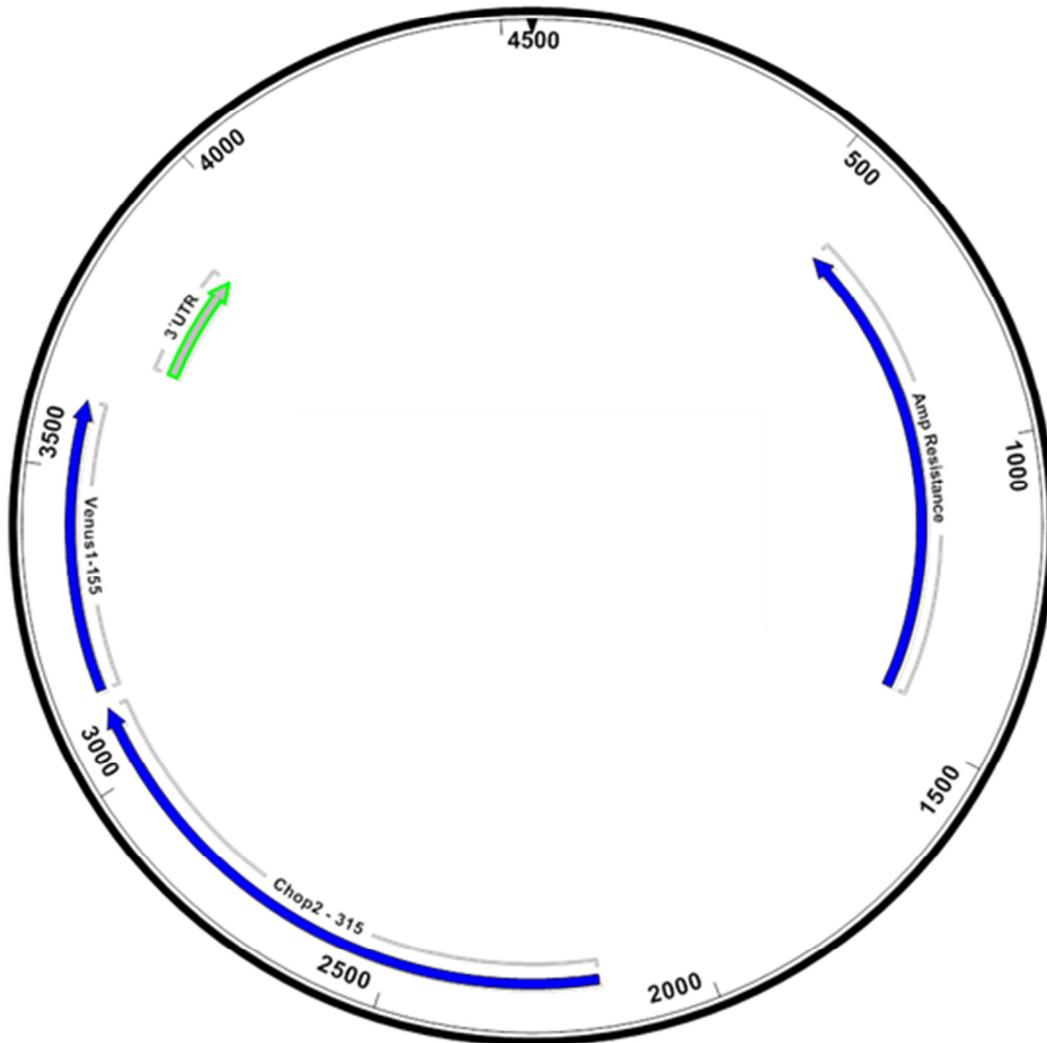
Primer	Sequenz 5`-3`
ChR2-C128T fwd.	tgg ctt ctc acc acc ccg gtc att ctc at
ChR2-C128T rev.	atg aga atg acc ggg gtg gtg aga agc ca
ChR2-C128A fwd.	tgg ctt ctc acc gcc ccg gtc att ctc at
ChR2-C128A rev.	atg aga atg acc ggg gcg gtg aga agc ca
ChR2-C128D fwd.	tgg ctt ctc acc gac ccg gtc att ctc at
ChR2-C128D rev.	atg aga atg acc ggg tcg gtg aga agc ca
ChR2-D156A fwd.	ctg ctt gtg tct gct att ggc aca att
ChR2-D156A rev.	aat tgt gcc aat agc aga cac aag cag
ChR2-D156C fwd.	ctg ctt gtg tct tgt att ggc aca att
ChR2-D156C rev.	aat tgt gcc aat aca aga cac aag cag
ChR1-C167T fwd.	tgg ctg ctg acc acc cct gtc att ctt
ChR1-C167T rev.	aag aat gac agg ggt ggt cag cag cca
ChR1-C167A fwd.	tgg ctg ctg acc gcc cct gtc att ctt
ChR1-C167A rev.	aag aat gac agg ggc ggt cag cag cca
ChR1-D195C fwd.	ctg ctg gtg tca tgt atc ggc acg atc
ChR1-D195C rev.	gat cgt gcc gat aca tga cac cag cag
ChR1-USER fwd.	ggc tta aUa tgt cgc gga ggc cat ggc tt
ChR1-USER rev.	ggt tta aUc cct gcg tct cgt cgt cct cct c
ChR2-USER fwd.	ggc tta aUa tgg att atg gag gcg ccc tg
ChR2-USER rev.	ggt tta aUc cct tgc cgg tgc cct tgt tgac
BR-USER fwd.	ggc tta auc tgt tgg caa taa ctc caa cat
BR-USER rev.	ggt tta auc cgt cgc tgg tcg cgg c
HR-USER fwd.	ggc tta aua tga ctg aga cat tgc cac cgg
HR-USER rev.	ggt tta auc cgt cgt cag cgg gag t

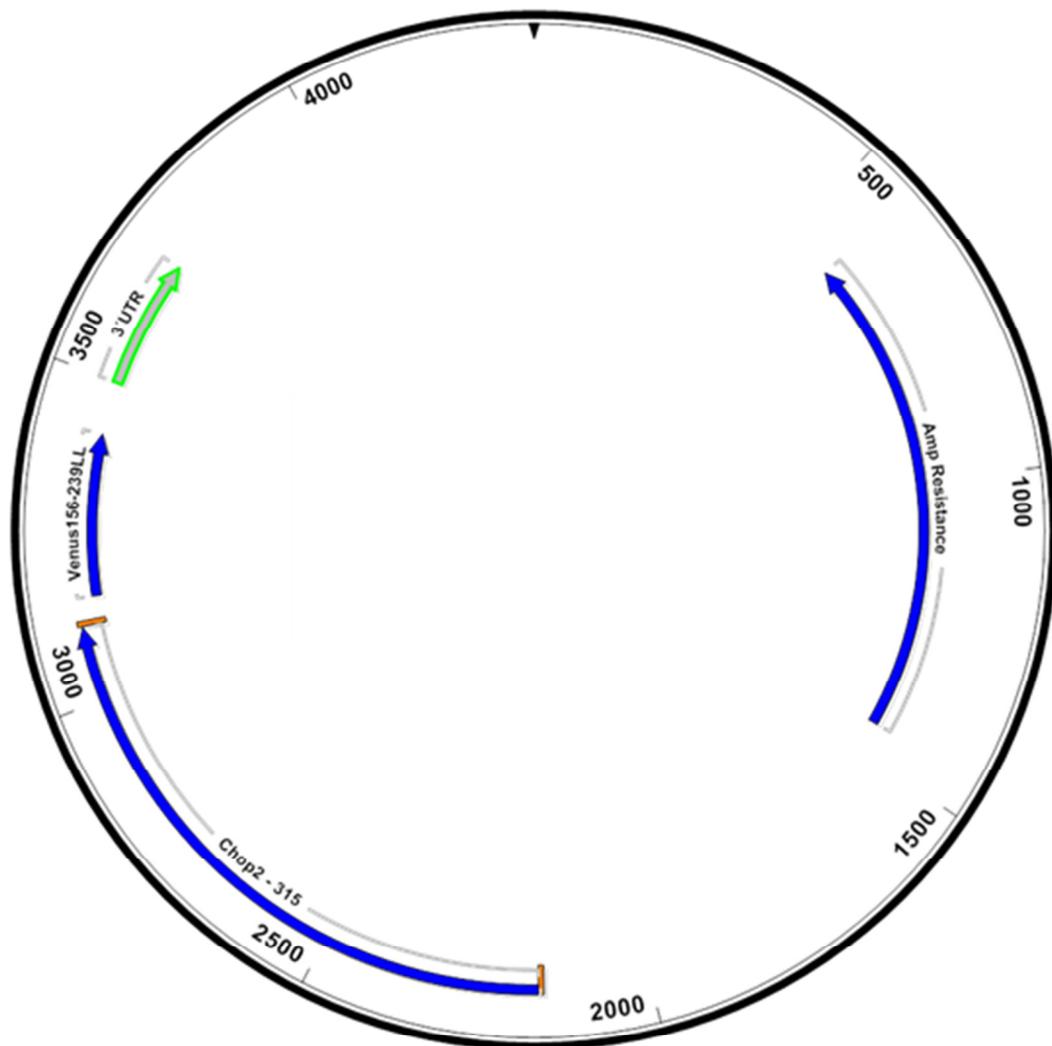
## Vektorkarten

Chop2-315::YFP/pGem-HE



**Chop2-315::YFP-N/pNB1**



**Chop2-315::YFP-C/pNB1**

## Publikationen:

- Bamann C, Gueta R, Kleinlogel S, Nagel G, Bamberg E** (2010) Structural guidance of the photocycle of channelrhodopsin-2 by an interhelical hydrogen bond. *Biochemistry* **49**: 267-278
- 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*. *Journal of Biological Chemistry* **286**(2): 1181-1188
- Ullrich S, Gueta R, Nagel G** (2012) Degradation of Channelopsin-2 in the Absence of Retinal and Degradation Resistance in certain Mutants. *Biological Chemistry eingereicht*
- Gueta R, Ullrich S, Nagel G** (2012) Channelrhodopsin-1 and 2: high expression mutants and in-vivo proof of dimerization. *Biological Chemistry eingereicht*

## Posterpräsentationen:

- Gueta R, Nagel G.** Characterization of slow Channelrhodopsin 2 mutants.  
Minisymposium "Channelrhodopsin and light-gated enzymes"  
Mai 2008, Frauenchiemsee
- Gueta R, Nagel G.** Structural analysis of channelrhodopsin mutants.  
Minisymposium "Channelrhodopsin and light-gated enzymes"  
Mai 2010, Hiddensee
- Gueta R, Nagel G.** Functional and structural analysis of channelrhodopsin mutants.  
SFB-487 Abschlußmeeting "Regulatorische Membranproteine"  
Juli 2011, Würzburg

## Vorträge:

- Gueta R, Nagel G.** Structural analysis of channelrhodopsin mutants by an electrophysiological approach.  
Minisymposium "Channelrhodopsin and light-gated enzymes"  
Mai 2010, Hiddensee

## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik der Universität Würzburg angefertigt. Ich möchte an dieser Stelle den Personen danken, die mich während dieser Zeit immer unterstützt haben und ohne deren Hilfe diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Herrn Prof. Dr. Georg Nagel danke ich für die Möglichkeit, dieses interessante Thema unter seiner Leitung zu untersuchen. Er stand mir während der gesamten Promotion mit Rat und Tat zur Seite, und hatte stets ein offenes Ohr für meine Ideen und Fragen.

Herrn Prof. Dr. Roland Benz danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Allen Mitarbeitern der AG Nagel danke ich für die tolle Atmosphäre und Unterstützung. Besonders hervorheben möchte ich Frieda Reisberg und Sybille Ullrich ohne die ein vernünftiges Arbeiten nicht möglich gewesen wäre.

Meinem Ex-Diplomanden Henrik Hülle danke ich für seine Bereitschaft, viel Zeit mit Blotapparaturen und Fluoreszenzmikroskopen zu verbringen. Auf seine Arbeit konnte ich mich immer verlassen.

Allen Kollegen und Freunden vom Julius-von-Sachs-Institut danke ich für das zeitaufwendige Korrekturlesen und vor allem für die vielen lustigen Abende, die wir gemeinsam verbracht haben.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie danken, die mir all dies überhaupt erst ermöglicht hat. Ihr hattet unendlich viel Geduld und seid immer für mich dagewesen.