

# Zellvorgänge steuern mittels Optogenetik

Prof. Dr. Thomas G. Oertner, Dr. Rolf T. Borlinghaus

Die Optogenetik ermöglicht das schnelle und gezielte Steuern von biologischen Vorgängen. Dabei kann es sich bei dem Untersuchungsgegenstand um Zellen in Kultur oder gar um sich frei bewegende Tiere handeln. Das An- und Ausschalten dieser Vorgänge mit Hilfe von durch Licht steuerbaren Proteinen hat das Feld der nicht-invasiven Funktionsanalyse revolutioniert. Besonders große Fortschritte wurden bei der Kontrolle von Neuronen erzielt, so zum Beispiel mit Channelrhodopsin (ChR), Bakteriorhodopsin oder Halorhodopsin. Aber auch über die Neurowissenschaften hinaus gewinnt die Optogenetik an Bedeutung. Mittlerweile gibt es optogenetische Werkzeuge unter anderem für Gliazellen, Muskelzellen oder embryonale Stammzellen. In unserem Expertenpanel wird diskutiert, welche Möglichkeiten die immer größer werdende Zahl verschiedener optogenetischer Werkzeuge für die Planung von Experimenten bietet. Außerdem werden die aktuellen Entwicklungen im Bereich der Optogenetik-Mikroskopie vorgestellt.



**Thomas Oertner**  
Direktor des  
Instituts für Synap-  
tische Physiologie  
(ISP) am Zentrum  
für Molekulare  
Neurobiologie  
Hamburg (ZMNH)

## LABORWELT

**Welche Möglichkeiten und Vorteile bieten zwei oder gar mehrere gekoppelte licht-aktivierbare Membranproteine?**

### Oertner

Um den Einfluss einer bestimmten Population von Nervenzellen auf das neuronale Netzwerk zu verstehen, ist es oft notwendig, die Aktivität dieser Neurone in positiver (d.h. Aktivierung) als auch in negativer Richtung (d.h. Hemmung) zu beeinflussen. Man möchte in ein- und derselben Population Aktionspotentiale künstlich auslösen und spontane Aktionspotentiale unterbinden können. Da uns mittlerweile sowohl de- als auch hyperpolarisierende optogenetische Wandler zur Verfügung stehen, kommt es nun darauf an, mehrere lichtgesteuerte Ionenkanäle oder Pumpen gemeinsam zu exprimieren.

Eine deutliche Verbesserung gegenüber der bekannten IRES-Strategie (interne ribosomale Eintrittsstelle, engl. *internal ribosomal entry site*) brachte die Entdeckung viraler *self-cleaving* Sequenzen, die es erlauben, von einer mRNA zwei getrennte Proteine zu produzieren. Die vielleicht sicherste Methode ist die direkte Kopplung zweier optogenetischer Wandler über einen flexiblen Linker, der eine Transmembrandomäne enthält. In der Praxis muss es möglich sein, den de- und hyperpolarisierenden Wandler eines solchen Tandemkonstrukts selektiv zu aktivieren, d.h. die Aktivierungs-

spektren sollten möglichst wenig überlappen. Außerdem müssen die Photoströme ausreichend groß sein, um endogene (synaptische) Ströme komplett dominieren zu können.

Neben der Netzwerkanalyse haben Tandemkonstrukte noch ein zweites Anwendungsgebiet: Bei der Entwicklung verbesserter optogenetischer Werkzeuge ist es oft erforderlich, die neuen Konstrukte mit gut charakterisierten „Standards“ zu vergleichen. Tandemkonstrukte ermöglichen stöchiometrische Expression und erlauben dadurch einen direkten Vergleich der Performance, der nicht durch Unterschiede im Expressionsniveau verfälscht werden kann. Eine interessante Entwicklungsrichtung für die Zukunft wäre die Kombination von Wandlern und Sensoren, wie zum Beispiel einem GFP-basierten Kalziumreporter. Die rasante Entwicklung multispektraler, LED-basierter Lichtquellen wird komplexe optogenetische Experimente für viele Labore noch attraktiver machen.



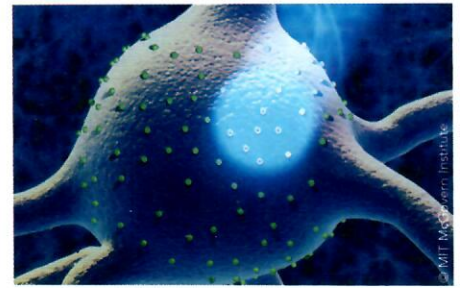
**Rolf Borlinghaus**  
Scientific Advisor  
bei Leica Microsys-  
tems, Mannheim

## LABORWELT

**Welche Beleuchtungs- und Aufnahmetechnologien werden die Optogenetik in den nächsten Jahren voranbringen?**

### Borlinghaus

Um lichtgesteuerte Proteine zu aktivieren, bedarf es Licht von passender Farbe. Wie in vielen anderen Bereichen, ist eine deutliche



**Optogenetik: Blaues Licht regt den Ionenkanal ChR2 an und aktiviert Nervenzellen.**

Verbreiterung der Farbpalette bei den in der Optogenetik eingesetzten Proteinen zu erwarten. Darum wird das gesamte sichtbare Spektrum zwischen 400nm und 800 nm zu bedienen sein. Für Weitfeld-Geräte, also „gewöhnliche“ Mikroskope und Stereomikroskope sind zur Zeit Lichtemissionsdioden (LEDs) im Trend. Diese Quellen sind kompakt und intensiv. LEDs haben gegenüber klassischen Lichtquellen viele Vorteile, z.B. einfache Kollimation, schnelle Schaltzeiten, vergleichsweise geringe Abwärme und eine lange Lebenszeit. Hier wird in den nächsten Jahren sicher noch einiges an Entwicklungspotential ausgeschöpft werden.

Die Alternative zum Weitfeld sind Rastergeräte. Insbesondere bekannt durch die konfokale Mikroskopie, wo zu einer Zeit immer nur ein Punkt beleuchtet wird, der möglichst klein (beugungsbegrenzt) sein soll. Für solche Anwendungen sind Laser nach wie vor die besten Quellen, da sie die höchste Leuchtdichte bieten und perfekt fokussierbar sind. Die Verbindung hochenergetischer Infrarot-Puls laser mit einem Substrat zur Erzeugung eines sehr breiten Spektrums, etwa einer Faser mit einem Matrix-Kern (*photonic crystal fiber*), haben in der jüngsten Zeit den Traum einer weißen Quelle mit Lasereigenschaften Wirklichkeit werden lassen (*WLL: white light laser*). Solche Systeme können in Zusammenarbeit mit akustooptisch abstimmbaren Filtern (AOTF) jede beliebige Farbe des sichtbaren Spektrums erzeugen, wobei gleichzeitig mehrere Spektralfarben ausgewählt werden können – und die Auswahl in ein paar Mikrosekunden umgeschaltet werden kann. Das kann insbesondere für schnell synchronisierte Belichtungsmuster von unterschiedlichen lichtgesteuerten Proteinen sehr interessant werden.

Für Experimente mit lebenden Säugetieren werden Mikroskope eingesetzt, die über einen stabilen Tisch verfügen, auf dem die Tiere gut montiert werden können. Die Fokussierung muß dann über das Objektiv erfolgen, da das Untersuchungsobjekt oft mit allerlei Mikroelektroden verdrahtet ist, und dann nicht mehr bewegt werden kann. Hier sind vielfältige Neuerungen, sowohl in der optischen Fokussierung als auch bei Halterung und Versorgung des Objektes zu erwarten. Hinzu kommt der vermehrte Einsatz von Lichtleitern in Hirn- und Gewebesonden, die üblicherweise mit Lasern oder LEDs gespeist werden.