



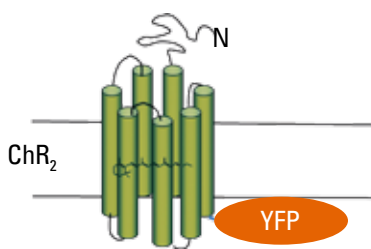
Licht steuert Nervenzellen mit höchster Präzision

Die Optogenetik revolutioniert die Neurowissenschaften

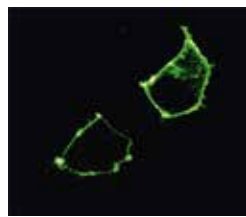
von Ernst Bamberg

Mit der Optogenetik hat sich in der Neurowissenschaft eine Revolution vollzogen. Die Optogenetik erlaubt, Nervenzellen einfach mit Licht und mit bis dato nicht gekannter Genauigkeit zeitlich und räumlich elektrodenfrei an- und abzuschalten. Dies wird durch das Einbringen genetisch codierter Lichtschalter, sogenannter mikrobieller Rhodopsine, in den Nervenzellen erreicht. Die Methode, die in Frankfurt und in Regensburg ihren Ursprung genommen hat, wird heute in der Neurobiologie weltweit eingesetzt. Neben der Grundlagenforschung eröffnen sich dank der Optogenetik auch neue biomedizinische Perspektiven zur Genterapie neurodegenerativer Krankheiten.

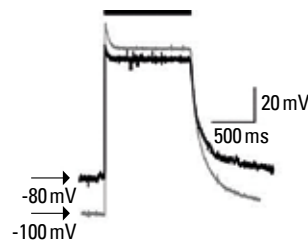
Bereits 2002 und 2003 veröffentlichten wir (Georg Nagel, Peter Hegemann und der Autor) zwei Arbeiten, in denen die Funktion von Algenrhodopsinen als lichtgesteuerte Kationenkanäle beschrieben wird. Einzellige Teichalgen vom Typ *Chlamydomonas reinhardtii* besitzen einen Augenfleck, mit dem die Einzeller »sehen« und lichtabhängig optimale Lebensbedingungen durch fototaktische Schwimmbewegungen erreichen. Die lichtempfindlichen Proteine im Augenfleck sind Rhodopsine, die von uns als lichtgesteuerte Kationenkanäle beschrieben wurden und als Channelrhodopsin 1 und 2 (ChR1,2) benannt wurden. [1, 2]



1a



1b



1c

Unser Nervensystem kann als komplexer elektrischer Schaltkreis dargestellt werden. Die elektrischen Eigenschaften der Neuronen werden über die Ionenpermeabilität der die Zelle umgebenden Membran geregelt. Als Ladungsträger dienen positiv geladene Natriumionen, Kaliumionen und Kalziumionen, deren Transport über die Membran durch Proteine (Ionenpumpen, Ionenkanäle) zum Teil spannungsabhängig bewerkstelligt wird. Jede Zelle ist in der Lage, mit bis zu 10.000 Verknüpfungen, den Synapsen, mit anderen Zellen zu kommunizieren, was die Komplexität eines neuronalen Netzes verdeutlicht. Insgesamt sind im menschlichen Gehirn bei bis zu 100 Milliarden Neuronen bis zu 10^{80} Verknüpfungen möglich, eine Zahl, die etwa die Anzahl aller Atome des Universums darstellt, also »unendliche Möglichkeiten«.

Im Ruhezustand der Zellen wird stets ein negatives Membranpotenzial (Hyperpolarisation) aufrechterhalten. Aktivierende Signale bewirken, dass positive Natriumionen in die Zelle einströmen, wodurch das Membranpotenzial angehoben und die elektrische Erregung ausgelöst werden, das heißt, die Neuronen beginnen zu feuern. Im zeitlichen Verlauf von wenigen Millisekunden wird durch Ausströmen von Kaliumionen die Zelle repolarisiert und damit in den Ruhezustand übergeführt. Das Feuern der Nervenzellen, die sogenannten Aktionspotenziale, sind wesentlicher Bestandteil der Signalübertragung zwischen Nervenzellen. Herkömm-

liche Methoden, mit denen man diese Prozesse untersucht, beruhen auf der direkten Stimulation durch Mikroelektroden. Ihre zeitliche, aber vor allem räumliche Auflösung ist jedoch eingeschränkt im Vergleich zu einer möglichen direkten elektrodenfreien Lichtstimulierung.

Lichtschalter für die Nervenzelle

Mit der Entdeckung, dass insbesondere ChR2 als lichtgesteuerter Kationenkanal Zellen durch seinen nach dem Zellinneren gerichteten Kationentransport depolarisiert, wurde klar, dass wir hier ein hochinteressantes molekulares Werkzeug gefunden hatten, um elektrisch erregbare Zellen wie Nervenzellen mit Licht zu aktivieren.

1a Channelrhodopsin 2

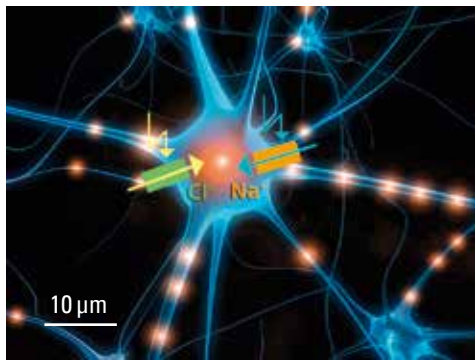
1b mit »Yellow fluorescent protein« zur Markierung des Kanals in der Zellmembran von HEK(Human Embryonic Kidney)-Zellen

1c Depolarisierung einer HEK-Zelle nach Belichtung, die Lichtphase ist durch den schwarzen Balken gekennzeichnet. Rhodopsine kommen in der Natur in verschiedenen Lebensbereichen vor: in Bakterien, in Pflanzen und in den Augen aller Tierarten mit unterschiedlichem molekularem Mechanismus, das heißt, als reine Sensoren für Signalketten (Auge, Bakterien), als Ionenpumpen (Bakterien) und überraschenderweise als Ionenkanäle (Algen).

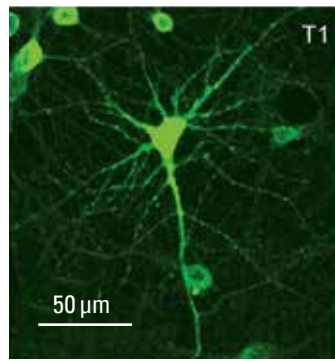
Das heißt, mit den genetisch kodierten Lichtschaltern sollte es möglich sein, elektrodenfrei mit extrem hoher Ortsauflösung ohne jede mechanische Störung in neuronale Netze aktivierend einzugreifen, womit sich ganz neue

AUF DEN PUNKT GEBRACHT

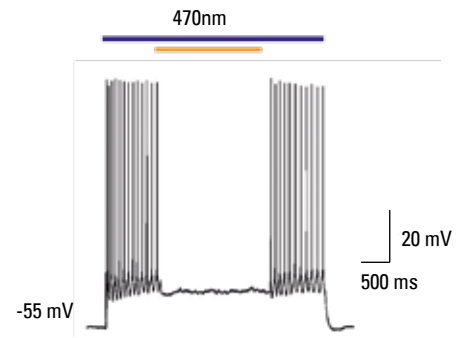
- In der Optogenetik ersetzen mit Licht steuerbare Ionenkanäle die zuvor in der Neurobiologie verwendeten Elektroden. Die Messungen weisen zeitlich und räumlich eine bis dato unerreichbare Präzision auf.
- Die Grundlagen der Optogenetik legten 2002 Forscher aus Frankfurt und Regensburg mit der Entdeckung des Ionenkanals Channelrhodopsin, wobei sie das Potenzial für die Neurowissenschaften sofort erkannten, wie in dem von ihnen veröffentlichten Patent dargestellt ist.
- Optogenetische Lichtschalter werden weltweit in mehr als 1000 neurobiologisch orientierten Laboratorien eingesetzt. Erste Erfolge mit biomedizinischem Hintergrund zeigten sich bei der Behandlung blinder Mäuse, die das Sehvermögen wiedererlangten.



2a



2b



2c

2a Schematische Darstellung der Wirkung von Channelrhodopsin2 (ChR2) und Halorhodopsin auf Nervenzellen. Aktivierung mit blauem Licht veranlasst ChR2, den Kanal zu öffnen. Dadurch können positiv geladene Natriumionen einströmen und das Neuron auf »an« schalten. Aktivierung mit gelbem Licht bringt Halorhodopsin dazu, negativ geladene Chloridionen in die Zelle zu pumpen. Die Zelle wird dadurch auf »aus« geschaltet.

2b Bild einer mit ChR2 und NphR transfizierten Nervenzelle.

2c Aktivierung des Feuerns mit blauem Licht (ChR2) und Inaktivierung mit gelbem Licht (NphR) [6].

Möglichkeiten zur Erforschung neurobiologischer Fragestellungen ergeben sollten.

Vorausschauend wurde 2002 von uns ein Patent angemeldet, wo bereits im Detail, wie später noch ausgeführt wird, die möglichen Anwendungen in der neurobiologischen Grundlagenforschung bis hin zur Biomedizin beschrieben werden. In Zusammenarbeit mit Karl Deisseroth und Ed Boyden, Stanford, wurde das von uns entwickelte ChR2-Konstrukt funktionell in kultivierten Mausneuronen exprimiert und diese dann durch Belichten zum Feuern gebracht. [3] Zeitgleich im selben Jahr 2005 wurde in Zusammenarbeit mit Alexander Gottschalk von der Goethe-Universität an dem Fadenwurm *C. elegans* die Lichtsteuerbarkeit an dem transgenen Tier gezeigt und damit überhaupt zum ersten Mal am lebenden Tier. [4]

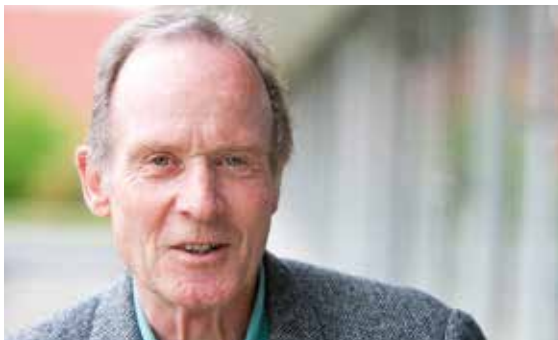
Wie aber können Nervenzellen mit Licht stillgelegt werden oder, anders ausgedrückt, hyperpolarisiert werden? Bereits 1995 hatten wir gezeigt, dass eine bakterielle lichtgetriebene Protonenpumpe, das Bakteriorhodopsin, elektrophysiologisch in der Membran von Eiern des südafrikanischen Krallenfrosches via genetischer Manipulation charakterisiert werden kann. Basierend auf diesen Arbeiten gelang es zusammen mit der Stanfordgruppe und mit Alexander Gottschalk, eine dem Bakteriorhodopsin verwandte lichtgetriebene Chloridpumpe in Neuronen und in *C. elegans* zu exprimieren. [5] Durch den einwärts gerichteten Chloridpumpstrom werden die Zellen hyperpolarisiert und damit stillgelegt. Aufgrund der unterschiedli-

chen Absorptionseigenschaften – ChR2 absorbiert blaues Licht (470 nm) und NphR gelbes Licht (570 nm) – können Neuronen, wenn beide Lichtschalter in einer Zelle exprimiert werden, mit blauem Licht »angeschaltet« und mit gelbem Licht »abgeschaltet« werden. Damit waren die Grundlagen geschaffen, auf denen das heute so benannte Arbeitsgebiet der Optogenetik beruht. Inzwischen werden diese Lichtschalter weltweit in mehr als 1.000 neurobiologisch orientierten Laboratorien eingesetzt. Als Zeichen, welche Bedeutung die Optogenetik inzwischen erreicht hat, sei erwähnt, dass die Methode eine zentrale Rolle bei der »US National Institutes of Health BRAIN Initiative« zur Kartierung des menschlichen Gehirns spielt.

Das Gehirn kartieren und Sehvermögen steigern

Durch die Weiterentwicklung der Molekularbiologie ist es heute möglich, mit Viren als Gefährten, zellspezifisch die Lichtschalter in Neuronen einzubringen. Mithilfe dieser Technik und mit transgenen Mäusen sind Experimente möglich geworden, wie man sie vor einigen Jahren nicht für möglich gehalten hätte. Daraus ergibt sich inzwischen eine große Menge an Publikationen, so dass hier exemplarisch nur einige Beispiele aufgeführt werden können. So lassen sich funktionelle Schaltkreise im Gehirn kartieren. In diesen Experimenten können mit Licht mit hoher Ortsauflösung elektrodenfrei verschiedene Schaltkreise im Gehirn angesteuert und die daraus resultierende Verhaltensänderung untersucht werden. Zum Beispiel können Forscher inzwischen mit Glasfasern bestimmte Bereiche des Mäusehirns belichten, wobei durch Reizung motorischer Zentren Bewegungsaktivität ausgelöst wird. Selbst Gedächtnisleistungen der Tiere können ortsspezifisch verstärkt oder gar gelöscht werden.

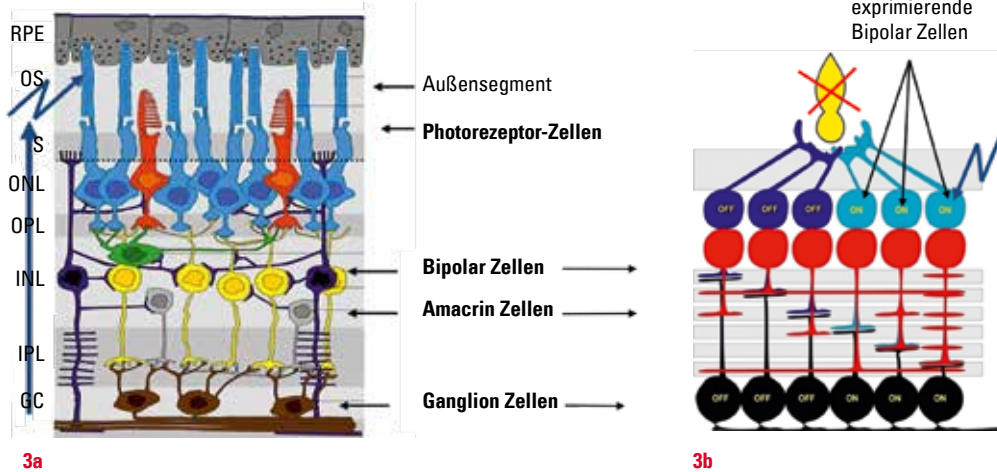
Die Erfolge im Tiermodell dienen zum weiteren Verständnis der Funktion der neuronalen Netze im Gehirn, sind aber auch die Grundlage für eventuelle biomedizinische Anwendungen. In Experimenten wurde gezeigt, dass blinde Mäuse, in deren Augen keine funktionsfähigen



Der Autor

Prof. Dr. Ernst Bamberg, Jahrgang 1940, ist Direktor des Frankfurter Max-Planck-Instituts für Biophysik und leitet dort die Abteilung für Biophysikalische Chemie. Zu seinen Forschungsschwerpunkten gehören mikrobielle Rhodopsine, lichtgesteuerte Ionenkanäle und lichtgetriebene Ionenpumpen, die in der Optogenetik zur Steuerung elektrisch aktivierbarer Zellen dienen.

ernst.bamberg@biophys.mpg.de



3a, b Schematische Darstellung der Retina mit a und b ohne Photorezeptorzellen. Die Lichtaktivierung wird in a durch die natürlichen Photorezeptorzellen bewirkt, während in b die mit ChR2 transduzierten Bipolarzellen diese Aufgabe übernehmen. [7]

Literatur

- 1 Nagel G, Ollig D, Fuhrmann M, Kateriya S, Musti AM, Bamberg E, Hegemann P, Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae, *Science*, 2002, 296 2395–8.
- 2 Nagel G, Szellas T, Huhn W, Kateriya S, Adeishvili N, Berthold P, Ollig D, Hegemann P, Bamberg E, Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 100, 13940–13945 (2003).
- 3 Boyden ES, Zhang F, Bamberg E, Nagel G, Deisseroth K, Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity, *Nat Neurosci.*, 2005, 8 1263–8.
- 4 Nagel G, Brauner M, Liewald JF, Adeishvili N, Bamberg E, Gottschalk A., Light activation of channelrhodopsin-2 in excitable cells of *Caenorhabditis elegans* triggers rapid behavioral responses, *Curr Biol.* (2005), 15, 2279–84.
- 5 Zhang F, Wang LP, Brauner M, Liewald JF, Kay K, Watzke N, Wood PG, Bamberg E, Nagel G, Gottschalk A, Deisseroth K., Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry, *Nature*. 2007, 446, 633–9.

- 6 Kleinlogel S, Terpitz U, Legrum B, Gökbuget D, Boyden ES, Bamann C, Wood PG, Bamberg E., A gene-fusion strategy for stoichiometric and co-localized expression of light-gated membrane proteins, *Nat Methods*. 2011 8 1083–8.

- 7 Lagali, P. S., D. Balya, G. B. Awatramani, T. Münch, D. S. Kim, V. Busskamp, C. L. Cepko, B. Roska, Light-activated channels targeted to ON bipolar cells restore visual function in retinal degeneration., *Nat. Neurosci.* 11, 667–75 (2008).

- 8 Hernandez VH, Gehrt A, Reuter K, Jing Z, Jeschke M, Mendoza Schulz A, Hoch G, Bartels M, Vogt G, Garnham CW, Yawo H, Fukazawa Y, Augustine GJ, Bamberg E, Kügler S, Salditt T, de Hoz L, Strenzke N, Moser T., Optogenetic stimulation of the auditory pathway, *J Clin Invest*. 2014, 124, 1114–29.



4a, b, c zeigt die Bewegung einer mit ChR2 in den Bipolarzellen der Retina einer transduzierten Maus im Dunkeln und nach Belichtung a und die Kontrollen in b und c, b die unbeeinträchtigte blinde Maus, c ein normal sehendes Tier. Es ist klar zu erkennen, dass die behandelte Maus sich bezüglich der Lichtumgebung etwa gleich verhält wie das gesunde Tier. [7]

Lichtsinnzellen mehr vorhanden sind, bereits ihre Lichtempfindlichkeit zurückerlangt haben, indem in den Lichtsinneszellen nachgeschalteten Zellen Channelrhodopsin-2 eingebracht wurde (Abb. 4a-c). [7] Auf lange Sicht könnte in Analogie ein gentherapeutischer Ansatz Menschen helfen, die unter Erblindung leiden, ausgelöst durch Makuladegeneration oder andere Sehstörungen. Sie könnten das Sehvermögen, wenn auch begrenzt, wiedererlangen. Das wäre eine vielversprechende Alternative zur Behandlung mit photosensitiven Implantaten, sogenannten Sehchips. Analoge Studien an der Maus zum »optischen Hören«, das heißt einem optogenetischen Ersatz für die Elektrodenstimulation im Innenohr, werden zurzeit mit einigem Erfolg durchgeführt. [8] Weitere Ansätze bestehen allerdings auf lange Sicht darin, die heute bei der Parkinson-Krankheit erfolgreich eingesetzte, elektrodenbasierte Tiefenhirnstimulation durch die Optogenetik auf-

grund der hohen Zellspezifität zu verbessern, ein Unterfangen, das aufgrund der Komplexität eines gentherapeutischen Ansatzes im menschlichen Gehirn nach Ansicht des Autors, wenn überhaupt, erst in mehr als zehn Jahren zum Tragen kommen kann. Ähnliche Ansätze werden zur Behandlung von Epilepsie und anderer neurodegenerativer Krankheiten diskutiert.

Die Optogenetik eröffnet der neurowissenschaftlichen Grundlagenforschung vielfältige Möglichkeiten. Sie wird weltweit bereits in vielen Labors genutzt und hat zu einer Reihe von neuen Erkenntnissen geführt. Auch wenn auf dem Weg zu biomedizinischen Anwendungen noch zahlreiche Hürden und Risiken zu bewältigen sind, verspricht die Methode aufgrund der Zellspezifität, gepaart mit der hohen Ortsauflösung, neuartige Ansätze für neurologische Behandlungsstrategien zu liefern, wie sie mit der herkömmlichen Elektrodenstimulation nicht möglich sind. ●