



Die frühe Entstehung der ionenleitenden Pore in Channelrhodopsin-2**

Jens Kuhne, Kirstin Eisenhauer, Eglof Ritter, Peter Hegemann,* Klaus Gerwert* und Franz Bartl

Abstract: Kanalrhodopsine (Channelrhodopsins, ChRs) sind lichtgesteuerte Ionenkanäle, die zahlreiche Anwendungen in der Optogenetik finden. Sie ermöglichen die genaue Kontrolle neuronaler Aktivität durch Licht. Hier entwickeln wir auf der Basis zeitaufgelöster FTIR-Spektroskopie ein Modell für die frühe Bildung der ionenleitenden Pore auf molekularer Ebene. Die Photo-Isomerisierung des Retinal-Chromophors führt zu einer Abwärtsbewegung der hochkonservierten Aminosäure E90; dies öffnet die Pore. Moleküldynamik(MD-Simulationen zeigen das Eindringen von Wassermolekülen durch diese Öffnung in das hydrophobe Vestibül oberhalb der Pore. Dadurch kippt Helix 2, und der Kanal öffnet sich vollständig innerhalb von Millisekunden. Da E90 in ChRs hochkonserviert ist, könnte das hier vorgestellte „E90-Helix2-tilt(EHT)-Modell“ einen generellen Aktivierungsmechanismus darstellen. Es eröffnet einen neuen Ansatz für weitere mechanistische Studien sowie die Möglichkeit, den Kanal für spezifische Anwendungen maßzuschneidern.

Kanalrhodopsine (CHRs) sind mikrobielle Rhodopsine, die bei Belichtung Kationen leiten.^[1] Die Lichtanregung führt zu einer all-*trans*-zu-13-*cis*-Isomerisierung des Retinal-Chromophors, was eine zyklische Sequenz von Konformationsänderungen im Protein in Gang setzt. Diese sind auf Zeitskalen von Picosekunden bis Sekunden als Photozyklusintermediate P500, P390, P520 und P480 detektierbar (Einschub in Abbildung 1 B). Durch einen aktinischen Lichtblitz hervorgeru-

fen, entsteht der leitende Zustand P520 aus P390 mit einer Anstiegszeit von 3 ms. Mit dem Übergang zum späten Photozyklusintermediat P480^[2–5] schließt sich der Kanal unter unseren Messbedingungen innerhalb von 40 ms. Bei kontinuierlicher heller Lichteinstrahlung werden die meisten Chr2-Moleküle direkt aus P480, jedoch nicht aus dem dunkeladaptierten Zustand D470 heraus aktiviert. Die Reste E82, E83, E90, und E101 aus Helix 2 (H2) sind alle an der Kanalleitung und -selektivität beteiligt.^[6–11] Insbesondere E90 ist ein Teil der ionenleitenden Pore und ein Element des zentralen Schalters, worauf zeitaufgelöste Fourier-Transform-Infrarot(FTIR)-Experimente, elektrophysiologische Messungen und Homologiemodellierung schließen lassen.^[12] Unter Verlust der Kationenleitung wandelt der Austausch von E90 gegen Lysin oder Arginin den Kationenkanal in einen Chloridkanal um.^[13]

Hier klären wir mithilfe einer Kombination von „Step-Scan“-FTIR-Spektroskopie, Homologiemodellierung und Moleküldynamik(MD)-Simulationen von proteingebundenen Wassermolekülen die frühe Porenbildung auf. Nach der Retinalisomerisierung öffnet die Schlüsselgruppe E90 die Pore an ihrer engsten Stelle. Dazu klappt E90 nach unten und wird deprotoniert. Dies ermöglicht das Eindringen von Wassermolekülen und erzeugt eine H2-Kippbewegung, was zu einem Aufweiten der Pore und zum Wassereinfluss von beiden Seiten führt. Wir stellen diesen Mechanismus hier als „E90-Helix2-tilt-(EHT)-Modell“ vor.

In Abbildung 1 sind die Homologiemodelle basierend auf dem C1C2-Röntgenstrukturmodell der Chimäre^[1] für den geschlossenen (Abbildung 1 A) und frühen geöffneten (Abbildung 1 B) Zustand gezeigt (eine ausführlichere Beschreibung der Homologiemodellierung und der MD-Simulationen ist im Abschnitt „Material und Methoden“ und der Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen zu finden). Die frühe, aber noch nicht vollständige Öffnung der Pore ist anhand der Dynamik von proteininternen Wassermolekülen sichtbar. Die Deprotonierung von E90 scheint essenziell für die Porenbildung zu sein, wie schon in FTIR-Experimenten mit ms-Zeitauflösung gezeigt wurde.^[12]

Hier haben wir durch den Einsatz der Step-Scan-Technik^[14,15] die Zeitauflösung bis in den Nanosekundenbereich erhöht. Mit einem Nanosekunden langen Laserblitz wurde in Lipidvesikeln rekonstituiertes Wildtyp(WT)-Chr2 bei $\lambda = 470$ nm angeregt, und die IR-Absorptionsänderungen von 200 ns bis 140 s im Wellenzahlbereich von $\tilde{\nu} = 1800$ –1000 cm^{-1} sowie im sichtbaren Spektralbereich bei $\lambda = 390$ und 520 nm aufgezeichnet. Gestützt auf diesen sehr vollständigen UV/Vis- und IR-Datensatz kann ein detaillierter molekularer Mechanismus über neun Größenordnungen in der Zeit abgeleitet werden, ähnlich wie es vorher an Bakteriorhodopsin

[*] J. Kuhne,^[†] K. Eisenhauer,^[†] Prof. Dr. K. Gerwert
 Lehrstuhl für Biophysik, Ruhr Universität Bochum
 Universitätsstraße 150, 44780 Bochum (Deutschland)
 E-Mail: gerwert@bph.rub.de

Dr. E. Ritter, Prof. Dr. P. Hegemann
 Experimentelle Biophysik, Humboldt Universität zu Berlin
 Invalidenstraße 42, 10115 Berlin (Deutschland)
 E-Mail: hegemann@rz.hu-berlin.de

Prof. Dr. F. Bartl
 Institut für Medizinische Physik und Biophysik, Charité
 Virchowweg 6, 10115 Berlin (Deutschland)

[†] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen.

[**] Wir danken Anja Koch und Roman Kazmin für ausgezeichnete technische Unterstützung bei der Vorbereitung der Chr2-Proben. Außerdem danken wir Erik Freier und Jürgen Schlitter für hilfreiche Diskussionen. Die Rechnungen wurden am Max-Planck-Partnerinstitut für Computational Biology (Shanghai High Performance Computing cluster) durchgeführt. Wir bedanken uns für die finanzielle Unterstützung durch PURE („Protein Research Unit Ruhr within Europe“) (K.G.) und durch die DFG (SFB 1078 B1, B2, B5, P.H. und F.B.; SFB 642, A1, K.G.)



Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201410180> zu finden.

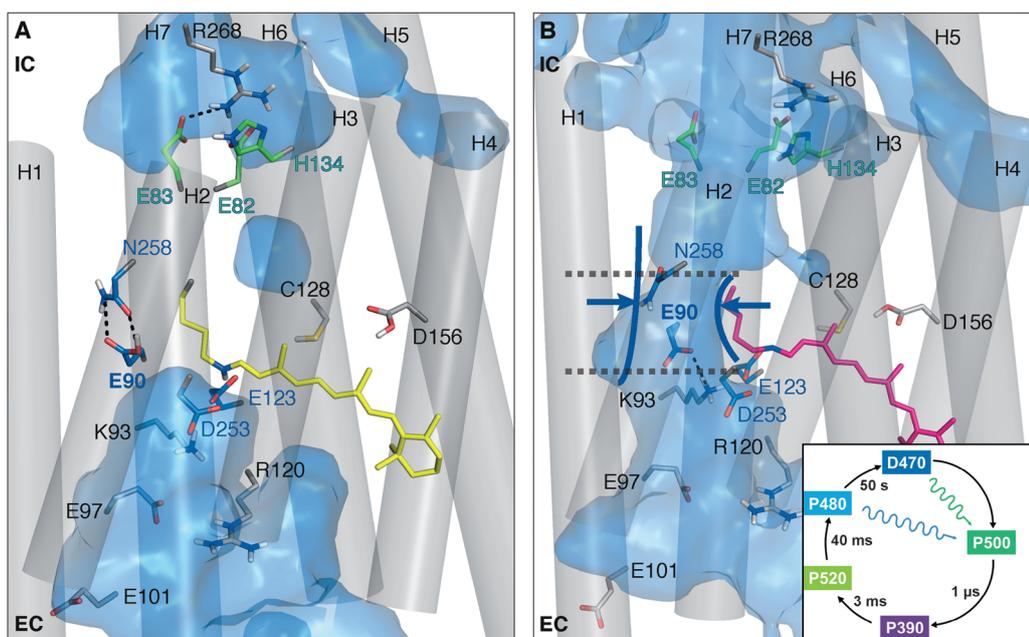


Abbildung 1. ChR2 im A) dunkeladaptierten (geschlossenen) und B) lichtadaptierten (frühen geöffneten) Zustand. (Photozyklus von ChR2 nach Lit. [3], die Halbwertszeiten beziehen sich auf in Lipidvesikeln rekonstituiertes ChR2 unter unseren Messbedingungen; Einschub in B). Die Dynamik der Wassermoleküle wird durch die blaue Oberfläche gekennzeichnet. Dies veranschaulicht die Öffnung der Pore am engsten Punkt. A) Geschlossener dunkeladaptierter Zustand. E90 zeigt nach innen und bildet zwei Wasserstoffbrücken zu N258, was Helix H2 mit Helix H7 verbindet. E83 ist an R268 über eine Wasserstoffbrücke gebunden und verbindet zusätzlich H2 mit H7 an der intrazellulären Seite des Proteins (IC). Beide Verbindungen verhindern den Wassereinstrom in das intrazelluläre Vestibül. B) Frühe Phase des geöffneten lichtadaptierten Zustands. Die Retinalisomerisierung führt zum Bruch der E90-N258-Verbindung, zur E90-Konformationsänderung von der Einwärts- (IC) zur Auswärtsorientierung (EC) und dadurch zum Bruch der Verbindung zwischen H2 und H7. Das deprotonierte E90 bildet eine neue Salzbrücke zu K93, was den Eintritt von Wassermolekülen aus dem Extrazellulärraum und ein Auswärtskippen von H2 bewirkt. E83 wird dadurch von R268 getrennt: Dies ermöglicht den Eintritt von intrazellulären Wassermolekülen und die frühe Öffnung des Kanals.

gezeigt wurde.^[16] Absorptionsänderungen von Markerbanden ausgehend vom dunkeladaptierten Zustand D470 sind in Abbildung 2 gezeigt. Sie zeigen Protonierungsänderungen der Retinal-Schiff-Base (RSB; $\tilde{\nu} = 1190 \text{ cm}^{-1}$) und ausgewählter Carbonsäuren ($\tilde{\nu} = 1718, 1728, 1760 \text{ cm}^{-1}$). Um die Protonierungsänderungen mit der Bildung der Photozyklusintermediate P390 und P520 in Bezug zu setzen, sind Extinktionsänderungen im UV/Vis-Bereich bei $\lambda = 390$ und 520 nm gezeigt. Zusätzlich dazu ist die Absorptionsänderung einer Bande bei $\tilde{\nu} = 1661 \text{ cm}^{-1}$ (blau) dargestellt, die einer Konformationsänderung^[17] oder einer Hydratisierung von α -Helices^[18] zugeordnet wurde.

Das unmittelbare Erscheinen der positiven Bande bei $\tilde{\nu} = 1190 \text{ cm}^{-1}$ zeigt die ultraschnelle all-*trans*-zu-13-*cis*-Retinalisomerisierung.^[4,17,19] Das Verschwinden der Bande bei $\tilde{\nu} = 1190 \text{ cm}^{-1}$ reflektiert die Deprotonierung der protonierten Schiff-Base (RSBH⁺) mit einer Halbwertszeit von 700 ns. Die Reprotonierung der RSB erfolgt in Übereinstimmung mit dem P390-nach-P520-Übergang mit $t_{1/2} = 3 \text{ ms}$ (Abbildung 2).^[3,5] Die Absorptionsänderungen bei $\tilde{\nu} = 1718, 1760$ und 1728 cm^{-1} spiegeln die Deprotonierung von E90 und die Protonierung der Gegenionen E123 und D253 wider. Die Zuordnung erfolgt durch den Vergleich von WT-Differenzspektren mit denen der jeweiligen Mutanten E123T (Abbil-

dung S9C der Hintergrundinformationen), D253N (Abbildung 7 in Lit. [18]) und E90Q,^[3,12] in denen die jeweils zugehörigen Banden verschwinden (weitere Details in Abbildung S2 der Hintergrundinformationen). Sowohl E123 als auch D253 werden zeitgleich mit $t_{1/2} = 700 \text{ ns}$ protoniert, mit der gleichen Kinetik, mit der die RSBH⁺ deprotoniert wird (Abbildung 2 und Abbildung S4 der Hintergrundinformationen). Die parallelen Protonierungen lassen darauf schließen, dass beide in verschiedenen ChR2-Molekülen als Akzeptoren des Schiff-Base-Protons fungieren können.^[1,8,20,21] Die Deprotonierung von E123 ($\tilde{\nu} = 1760 \text{ cm}^{-1}$) und D253 ($\tilde{\nu} = 1728 \text{ cm}^{-1}$) geschieht während des Schließens des Kanals und des Übergangs in das P480-Intermediat mit ca. 40 ms (Abbildung 2).

Das Erscheinen sowohl der durch E90 hervorgerufenen negativen Bande bei $\tilde{\nu} = 1718 \text{ cm}^{-1}$ als auch der positiven Isomerisierungsmarkerbande bei $\tilde{\nu} = 1190 \text{ cm}^{-1}$ (Abbildung 2, Abbildung S3 der Hintergrundinformationen) erfolgt in weniger als 200 ns und daher hier nicht zeitaufgelöst. Aufgrund des schlechteren Signal-zu-Rausch-Verhältnisses (SNR) können auf der frühen Zeitskala ($< 1 \mu\text{s}$) Wasserstoffbrückenänderungen und Deprotonierung von E90 nicht unterschieden werden. Allerdings ist E90 im P390-Intermediat klar deprotoniert, also deutlich früher, als der Kanal sich öffnet. E90 reprotoniert nur im letzten Schritt des Photozyklus während des Übergangs von P480 zum vollständig dunkeladaptierten Zustand D470.^[12] Folglich ist die Deprotonierung von E90 nur sichtbar, wenn der Photozyklus aus dem vollständig dunkeladaptierten Zustand gestartet wird, jedoch nicht, wenn der lichtadaptierte Zustand P480 angeregt wird.^[18] Das Erscheinen der negativen Bande bei $\tilde{\nu} = 1661 \text{ cm}^{-1}$ (blau in Abbildung 2) geschieht auf einer Zeitskala von 0.5 ps und ist hier ebenfalls nicht zeitaufgelöst.^[17] Der zweiphasige Zerfall dieser Bande begleitet das Schließen der Pore ($t_{1/2} \approx 40 \text{ ms}$) und die Wiederherstellung des dunkeladaptierten Zustands mit gleichzeitiger E90-Reprotonierung ($t_{1/2} \approx 48 \text{ s}$). Da die Hydratisierung von α -Helices ebenso zu dieser Bande beiträgt,^[18] ist dies wahrscheinlich ein Hinweis auf Wasser-

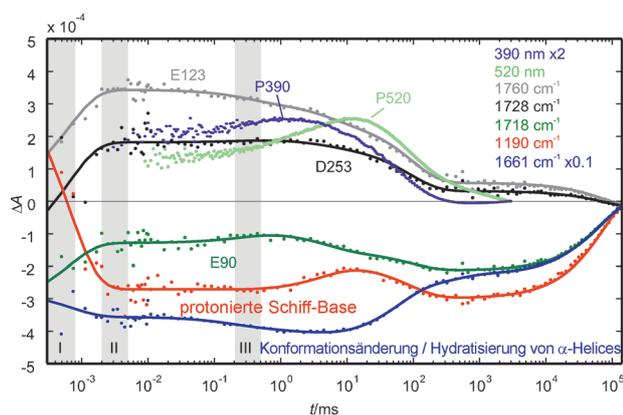


Abbildung 2. IR- und UV/Vis-Absorptionsänderungen von WT-ChR2. Gezeigt sind Absorptionsänderungen von Carbonylbanden von E123 bei $\tilde{\nu}=1760\text{ cm}^{-1}$ (grau), D253 bei $\tilde{\nu}=1728\text{ cm}^{-1}$ (schwarz) und E90 bei $\tilde{\nu}=1718\text{ cm}^{-1}$ (dunkelgrün) sowie die Retinal-C-C-Streckschwingung bei $\tilde{\nu}=1190\text{ cm}^{-1}$ (rot), die Protonierungsänderungen dieser Reste anzeigen. Im Vergleich dazu sind die Zeitverläufe von P390 in Violett und P520 in Grün dargestellt. In Blau ist der zeitliche Verlauf der Bande bei $\tilde{\nu}=1661\text{ cm}^{-1}$ gezeigt. Die grauschattierten Bereiche (I–III) entsprechen den Differenzspektren in Abbildung S3 der Hintergrundinformationen (Der IR-Datensatz ist um das Hitzeartefakt korrigiert (Abbildung S4 der Hintergrundinformationen), und der UV/Vis-Datensatz ist skaliert und verschoben (Abbildung S5 der Hintergrundinformationen)). Die durchgehenden Linien entsprechen dem Ergebnis einer global-kinetischen Analyse (Abbildung S4 und „Material und Methoden“ in den Hintergrundinformationen). Da alle Wellenzahlen in die Globalanalyse eingehen, werden auch Bereiche mit niedrigem Signal-zu-Rausch-Verhältnis zuverlässig nachgewiesen. (Die Reproduzierbarkeit ist in Abbildung S3–S5 der Hintergrundinformationen gezeigt.)

moleküle, die gleichzeitig mit der E90-Reprotonierung den Kanal verlassen.

Um einen detaillierteren Struktureinblick in die funktionelle Rolle von E90 zu erlangen, wurden MD-Simulationen mit dem auf der C1C2-Chimären-Kristallstruktur basierenden Homologiemodell von ChR2 durchgeführt (Abbildung 1). Dieses Vorgehen ermöglicht es uns, die experimentell erhaltenen Befunde vor dem Hintergrund unseres Strukturhomologiemodells zu diskutieren. Dazu haben wir das Modell des dunkeladaptierten geschlossenen Zustandes um das lichtadaptierte Homologiemodell des offenen Zustands erweitert. Hierzu haben wir die Isomerisierung um die C13=C14-Bindung durch Rotation in 20°-Schritten und Fixierung der C12-C13=C14-C15-Torsion erzeugt. Diese relativ grobe Näherung der Retinalisomerisierung berücksichtigt keine Einzelbindungsverdrillungen. Diese werden sicher auch eine wichtige Rolle für die exakte Positionierung der Schiff-Base spielen und sind hier nur eine erste grobe Näherung. Für die Positionierung der Proteinseitenketten spielt dies vermutlich aber eine untergeordnete Rolle. Die Strukturen vor (all-trans) und nach Isomerisierung des Retinals (13-cis) sind in Abbildung 3 A gezeigt. Für die dunkeladaptierte all-trans-Retinalkonfiguration ist E90 in H2 über zwei Wasserstoffbrücken mit N258 in H7 verbunden, was die Seitenketten von E90 und N258 in fixierten Konformationen hält und ebenfalls für die C1C2-Chimären-Kristallstruktur vorhergesagt

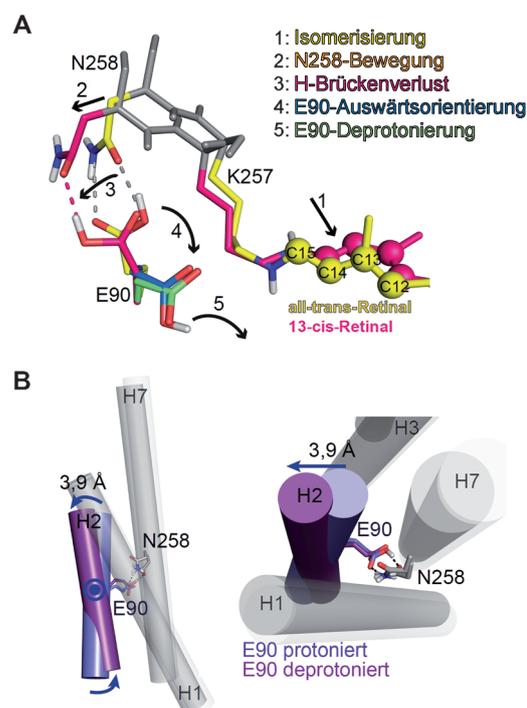


Abbildung 3. All-trans-zu-13-cis Isomerisierung und H2-Bewegung in ChR2 resultierend aus MD-Simulationen. A) Die Seitenketten sind farbig, das Proteinrückgrat ist in Grau dargestellt. Die all-trans- und die 13-cis-Retinalkonfigurationen sind in Gelb bzw. Magenta gezeigt. Die Isomerisierung (1) erzeugt eine Bewegung der K257- und dann der N258-Seitenketten (2), dieser folgt der Verlust einer Wasserstoffbrücke (3), die E90-Auswärtsorientierung (4) und die E90-Deprotonierung (5). B) Die Bewegung von H2 erfolgt aus der E90-Auswärtsorientierung und Deprotonierung. Die TM (=transmembranäre) H2 ist für E90 in der Einwärtsorientierung (nach oben) in Lila und in Purpur für die Auswärtsorientierung (nach unten) dargestellt. Nach der Auswärtsorientierung und Deprotonierung von E90 verkippt H2 um 3,9 Å auf der intrazellulären Seite des Proteins. E90 in H2 stellt für diese Bewegung das Scharnier dar.

wurde.^[1,13] Die Isomerisierung um die C13=C14-Bindung erzeugt eine Spannung innerhalb des Retinalmoleküls und des kovalent gebundenen Lysinrestes. Die Spannung wird für einen Torsionswinkel von 60° maximal. Sie wird über die Seitenkette von K257 auf das benachbarte N258 übertragen. Die mechanische Spannung generiert eine Bewegung der N258-Seitenkette. Dadurch werden die Wasserstoffbrücken zu E90 von zwei auf eine reduziert.

Die Schwächung der Wasserstoffbrücke zu N258 erhöht die konformative Flexibilität der E90-Seitenkette. Sie wird in der zweiten Hälfte der 100-ns-Simulation auswärts gerichtet (Abbildung 3). Liegt E90 in den MD-Simulationen deprotoniert vor, ist die Auswärtsorientierung noch deutlicher und klar bevorzugt, da diese Konformation von E90 durch eine Salzbrücke zu K93 stabilisiert wird (Abbildung 1B). Der Vergleich der gemittelten Strukturen der MD-Simulationen vor und nach der Retinalisomerisierung zeigt zusätzlich, dass H2 auf der intrazellulären Seite um 3,9 Å verkippt ist. Dabei bildet E90 das Scharnier dieser Bewegung (Abbildung 3B). Des Weiteren zeigen MD-Simulationen Unterschiede in der Verteilung interner Wassermoleküle zwischen der geschlos-

senen und der frühen geöffneten Struktur (Abbildung 1 A,B). Im dunkeladaptierten Zustand mit all-*trans*-RSBH⁺ besetzen Wassermoleküle bereits den extrazellulären Halbkanal bis auf Höhe der RSBH⁺ (Abbildung 1 A), wobei das intrazelluläre Vestibül zwischen dem „zentralen Tor“ und dem „inneren Tor“ unbesetzt bleibt. Dies wird durch zwei Engstellen im Protein bewerkstelligt: zum einen zwischen E90 und N258 am „zentralen Tor“ und zum anderen zwischen E83 und R268 am „inneren Tor“. So wird der Wassereinstrom in das intrazelluläre Vestibül sowohl aus Richtung des intrazellulären Raums als auch aus Richtung des extrazellulären Raums verhindert (Abbildung 1 A und Abbildung 4 A, Blick aus

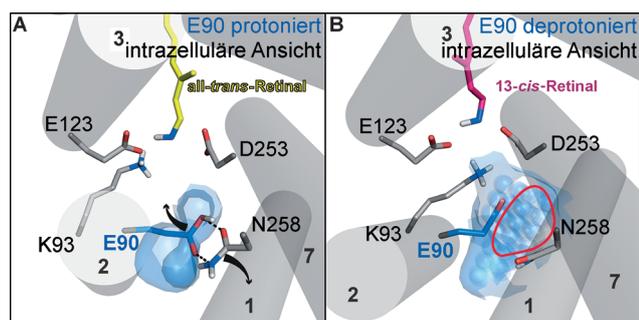


Abbildung 4. Bildung der wassergefüllten Pore nach E90-Deprotonierung. Die während der MD-Simulation mit Wasser besetzten Bereiche sind als blaue Oberflächen dargestellt. ChR2 ist von der intrazellulären Seite gezeigt, Wasserdichten sind für einen Bereich von 3 Å um E90 gezeigt, wie in Abbildung 1 B angedeutet. A) Geschlossener Zustand (E90 protoniert). B) Früher geöffneter Zustand: E90 ist deprotoniert und bildet eine Salzbrücke zu K93. H2 ist nach außen verkippt, und die Pore zwischen H1, H2 und H7 öffnet sich für den Wassereinstrom. Die Seitenketten von E90 und N258 bewegen sich dabei wie eine Schwingtür: E90 schwingt nach unten, N258 nach oben.

Richtung des intrazellulären Raums). In der simulierten frühen geöffneten Struktur mit 13-*cis*-Retinal liegt E90 in der auswärts gerichteten deprotonierten Konformation vor und bildet eine Salzbrücke zu K93. Daraus resultiert ebenfalls der Bruch der Verbindung zwischen den Helices H2 und H7 am „zentralen Tor“. Dies ermöglicht das Verkippen von H2 und führt dadurch zu einem Wassereinstrom von der extrazellulären Seite in das intrazelluläre Vestibül. Die Salzbrücken zwischen E83/R268 und E82/H134 (in H3) am „inneren Tor“ werden geschwächt und ermöglichen das Eindringen der Wassermoleküle aus dem intrazellulären Raum (Abbildung 1). Dadurch entsteht ein mit Wasser gefüllter Kanal über die gesamte Länge des Proteins mit E90 an der engsten Stelle (Abbildung 1 B). Die Bildung der Pore wird durch die Bewegung der beiden Reste E90 und N258 ermöglicht, ähnlich dem Öffnen einer Schwingtür (Abbildung 4). Die auswärts gerichtete Konformation und Deprotonierung von E90 öffnet die Pore, sodass Wasser eindringen kann.

Da die Konformation von E90 offensichtlich das frühe Öffnen der Pore bestimmt, haben wir im nächsten Schritt untersucht, wie die Konformation von E90 durch Punktmutationen beeinflusst wird und wie das elektrophysiologische Verhalten dieser Mutanten erklärt werden kann. Interessanterweise zeigt die E90Q-Mutante in MD-Simulationen eine

andere Konformation von Q90 im dunkeladaptierten Zustand als protoniertes E90 im dunkeladaptierten Zustand (Abbildung S9A der Hintergrundinformationen). Die beiden fehlenden Wasserstoffbrücken von Q90 zu N258 ermöglichen eine höhere konformative Flexibilität von Q90. So ist Q90 zu ca. 70% schon im dunkeladaptierten Zustand auswärts gerichtet, ähnlich dem deprotonierten E90 nach Lichtaktivierung. Dieses Ergebnis erklärt nun, warum die Q90-Mutante, obwohl sie nicht deprotoniert werden kann, kaum veränderte elektrische Ströme zeigt.

In vorherigen Studien wurde E90 durch positiv geladene Reste in E90K und E90R ersetzt.^[11–13] Dies kehrt die Kationenselektivität in eine Anionenselektivität um (ChloCs).^[13] Da sowohl Lysine als auch Arginine voluminöse Reste sind, können sie nicht die einwärts gerichtete Konformation einnehmen, bedingt durch den begrenzten Raum am „zentralen Tor“. Daher sind beide positiven Reste im dunkeladaptierten Zustand auswärts in das extrazelluläre Vestibül gerichtet. Die positive Ladung wird durch eine erhöhte Anzahl von Chloridionen neutralisiert. Da E90 eine Schlüsselrolle im „zentralen Tor“ spielt, das die engste Stelle in der leitenden Pore darstellt, ist zu erwarten, dass sowohl die Leitfähigkeit als auch die Selektivität empfindlich auf Strukturänderungen an dieser Position reagieren.

Die ChR2-E123T-Mutation, die so genannte ChETA (ChR2-E123T accelerated)-Variante, wird häufig in optogenetischen Anwendungen eingesetzt, die ein schnelles Auslösen von Aktionspotentialen erfordern.^[22] In MD-Simulationen beobachten wir ein verändertes Wasserstoffbrückennetzwerk am „zentralen Tor“ für unser E123T-Homologiemodell. E90 ist dort schon im dunkeladaptierten Zustand seitwärts zu D253 orientiert, statt wie im Wildtyp mit N258 eine Wasserstoffbrücke zu bilden (Abbildung S9B der Hintergrundinformationen). In dieser Orientierung zu D253 kann die Deprotonierung von E90 entweder erschwert sein, oder ein Teil des Ensembles kann schon im dunkeladaptierten Zustand deprotoniert vorliegen. Experimentell beobachten wir in der Tat eine reduzierte Intensität der E90-Bande in IR-Differenzspektren (Abbildung S9C der Hintergrundinformationen). Aus dieser Beobachtung lässt sich schließen, dass in der E123T-Mutante der Kanal schon im dunkeladaptierten Zustand vorgeöffnet ist.

Unsere Ergebnisse lassen sich zusammenfassend in dem EHT-Modell darstellen: Die all-*trans*-zu-13-*cis*-Isomerisierung des Retinals induziert eine Bewegung der N258-Seitenkette. In Übereinstimmung werden Konformationsänderungen im Proteinerückgrat anhand der Bande bei $\tilde{\nu} = 1661 \text{ cm}^{-1}$ im Picosekundenbereich beobachtet.^[17] Diese Bewegung bricht sehr schnell die Wasserstoffbrücken zwischen N258 und E90. E90 kann sich daher auswärts orientieren, wird deprotoniert und öffnet somit eine enge Pore. Wassermoleküle strömen in das Vestibül oberhalb der Pore ein. Der Bindungsbruch zwischen N258 und E90 trennt auch die interhelikalen Bindungen zwischen den Helices H2 und H7. Daher kippt H2 in den MD-Simulationen nach außen. Dies stimmt sehr gut mit der in EPR-Experimenten gemessenen lichtinduzierten Bewegung von H2 überein. Die Bewegung wurde mit spinmarkierten Cysteinen in H2 und H7 nachgewiesen (Abbildung S10 der Hintergrundinformationen).^[23,24]

Das eindringende Wasser scheint weiterhin die Salzbrücken zwischen E83/R268 und E82/H134 am „inneren Tor“ zu schwächen und somit eine größere Bewegung und eine weitere Öffnung der Pore zu induzieren. Eine Deprotonierung von E82 und E83 wird im IR-Spektrum nicht beobachtet (Abbildung 1B).

Im EHT-Modell wird ChR2 in zwei Schritten aktiviert. Zuerst induziert die Retinalisomerisierung die Auswärtsbewegung von E90, und die Pore wird ultraschnell geöffnet. Anschließend wird durch eindringendes Wasser Helix H2 gekippt und die Pore weiter geöffnet; schließlich entsteht ein durchgehender Kanal. Da E90 in ChRs hochkonserviert ist,^[25] könnte das hier vorgestellte EHT-Modell einen generellen Kanalaktivierungsmechanismus darstellen (Tabelle S1 der Hintergrundinformationen).

Wir stellen hier ein Modell vor, das ein Maßschneidern von optogenetischen Hilfsmitteln ermöglichen kann. Wir nehmen an, dass die biophysikalischen Eigenschaften wie Ionenselektivität, Leitfähigkeit und Öffnungskinetik, die wichtige Parameter für optogenetische Anwendungen sind, über die Modifikation der Schlüsselreste E90, E82 und E83 regulierbar sind. Das Abstimmen der Absorptionswellenlänge kann hingegen relativ unabhängig davon über die Modifikation der Retinalbindetasche, besonders der Gegenionen E123 und D253, erfolgen.

Stichwörter: Channelrhodopsin · IR-Spektroskopie · Moleküldynamik · Optogenetik

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 4953–4957
Angew. Chem. **2015**, *127*, 5037–5041

- [1] H. E. Kato, F. Zhang, O. Yizhar, C. Ramakrishnan, T. Nishizawa, K. Hirata, J. Ito, Y. Aita, T. Tsukazaki, S. Hayashi, et al., *Nature* **2012**, *482*, 369–374.
- [2] P. Berthold, S. P. Tsunoda, O. P. Ernst, W. Mages, D. Gradmann, P. Hegemann, *Plant Cell Online* **2008**, *20*, 1665–1677.
- [3] E. Ritter, K. Stehfest, A. Berndt, P. Hegemann, F. J. Bartl, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 35033–35041.
- [4] M.-K. Verhoeven, C. Bamann, R. Blöcher, U. Förster, E. Bamberg, J. Wachtveitl, *ChemPhysChem* **2010**, *11*, 3113–3122.
- [5] C. Bamann, T. Kirsch, G. Nagel, E. Bamberg, *J. Mol. Biol.* **2008**, *375*, 686–694.
- [6] Y. Sugiyama, H. Wang, T. Hikima, M. Sato, J. Kuroda, T. Takahashi, T. Ishizuka, H. Yawo, *Photochemical & Photobiological Sciences* **2009**, *8*, 328–336; *Photobiological Sciences* **2009**, *8*, 328–336.
- [7] S. Tanimoto, Y. Sugiyama, T. Takahashi, T. Ishizuka, H. Yawo, *Neurosci. Res.* **2013**, *75*, 13–22.
- [8] H. C. Watanabe, K. Welke, F. Schneider, S. Tsunoda, F. Zhang, K. Deisseroth, P. Hegemann, M. Elstner, *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 7456–7466.
- [9] A. P. Plazzo, N. De Franceschi, F. Da Broi, F. Zonta, M. F. Sanasi, F. Filippini, M. Mongillo, *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 4818–4825.
- [10] D. Gradmann, A. Berndt, F. Schneider, P. Hegemann, *Biophys. J.* **2011**, *101*, 1057–1068.
- [11] K. Ruffert, B. Himmel, D. Lall, C. Bamann, E. Bamberg, H. Betz, V. Eulenburg, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2011**, *410*, 737–743.
- [12] K. Eisenhauer, J. Kuhne, E. Ritter, A. Berndt, S. Wolf, E. Freier, F. Bartl, P. Hegemann, K. Gerwert, *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 6904–6911.
- [13] J. Wietek, J. S. Wiegert, N. Adeishvili, F. Schneider, H. Watanabe, S. P. Tsunoda, A. Vogt, M. Elstner, T. G. Oertner, P. Hegemann, *Science* **2014**, *344*, 409–412.
- [14] F. Garczarek, K. Gerwert, *Nature* **2006**, *439*, 109–112.
- [15] W. Uhmann, A. Becker, C. Taran, F. Siebert, *Appl. Spectrosc.* **1991**, *45*, 390–397.
- [16] K. Gerwert, E. Freier, S. Wolf, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2014**, *1837*, 606–613.
- [17] M.-K. Neumann-Verhoeven, K. Neumann, C. Bamann, I. Radu, J. Heberle, E. Bamberg, J. Wachtveitl, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 6968–6976.
- [18] V. A. Lórenz-Fonfría, T. Resler, N. Krause, M. Nack, M. Gossing, G. F. von Mollard, C. Bamann, E. Bamberg, R. Schlesinger, J. Heberle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, 201219502.
- [19] K. Gerwert, F. Siebert, *EMBO J.* **1986**, *5*, 805–811.
- [20] K. Welke, J. S. Frähmcke, H. C. Watanabe, P. Hegemann, M. Elstner, *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 15119–15128.
- [21] H. C. Watanabe, K. Welke, D. J. Sindhikara, P. Hegemann, M. Elstner, *J. Mol. Biol.* **2013**, *425*, 1795–1814.
- [22] L. A. Gunaydin, O. Yizhar, A. Berndt, V. S. Sohal, K. Deisseroth, P. Hegemann, *Nat. Neurosci.* **2010**, *13*, 387–392.
- [23] N. Krause, C. Engelhard, J. Heberle, R. Schlesinger, R. Bittl, *FEBS Lett.* **2013**, *587*, 3309–3313.
- [24] T. Sattig, C. Rickert, E. Bamberg, H.-J. Steinhoff, C. Bamann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 9705–9708; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 9887–9890.
- [25] N. C. Klapoetke et al., *Nat. Methods* **2014**, *11*, 338–346.

Eingegangen am 17. Oktober 2014

Online veröffentlicht am 23. Dezember 2014