

Optochemische Genetik

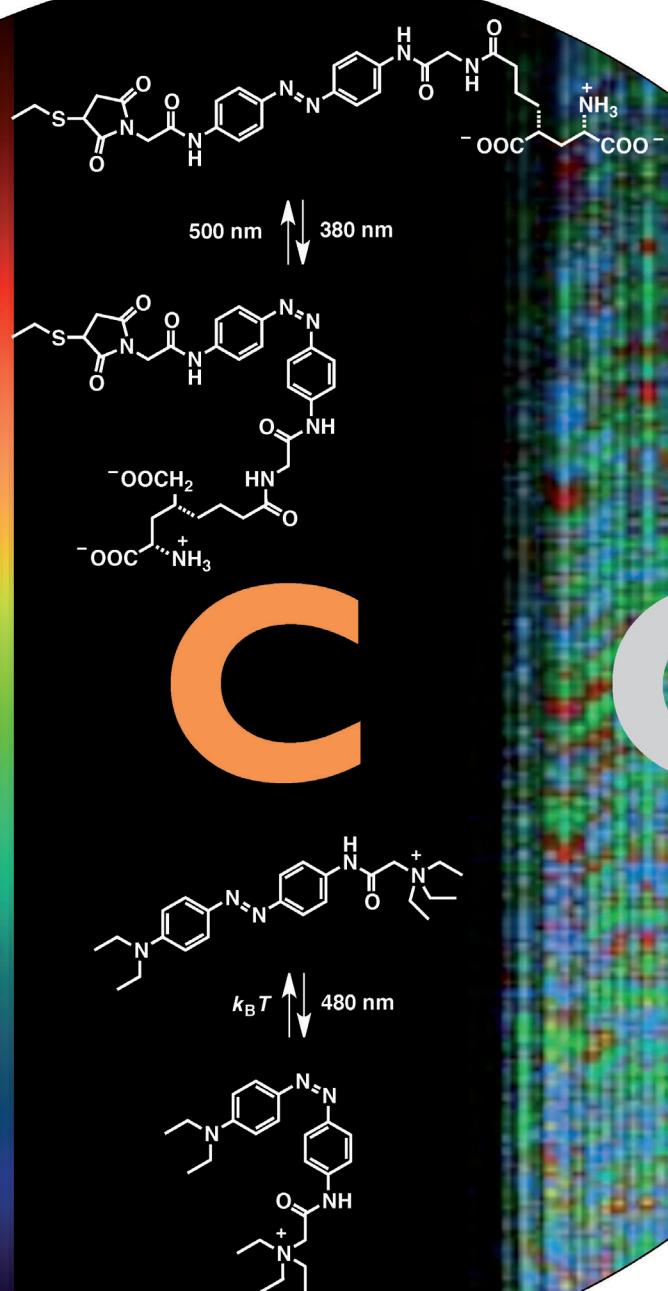
Timm Fehrentz, Matthias Schönberger und Dirk Trauner*

Stichwörter:

Chemische Genetik · Ionenkanäle ·

Optogenetik · Photoschalter ·

Rezeptoren



Transmembranrezeptoren ermöglichen die Kommunikation zwischen Zellen und ihrer Umgebung. Die Stimuli, die diese Rezeptoren aktivieren, treten in Form von Änderungen der Ligandenkonzentration (z. B. Hormone oder Neurotransmitter), der Temperatur, des Drucks (z. B. Schallwellen oder Berührungen), des Transmembranpotentials oder der Lichtintensität auf. Viele Transmembranrezeptoren sind heutzutage in atomarer Auflösung charakterisiert, und unser Verständnis ihrer funktionellen Eigenschaften hat sich in vergangenen Jahren deutlich verbessert. Infolgedessen können diese hochentwickelten molekularen Maschinen umprogrammiert und gegenüber unnatürlichen Reizen sensibilisiert werden. In diesem Aufsatz zeigen wir, wie spannungs- und ligandengesteuerte Ionenkanäle mit synthetischen Lichtschaltern ausgestattet werden können. Die daraus resultierenden künstlichen Lichtrezeptoren können genutzt werden, um neurale Aktivität mit einer außergewöhnlichen zeitlichen und räumlichen Präzision optisch zu kontrollieren. Sie sind bereits erfolgreich in lebenden Systemen eingesetzt worden und könnten in Zukunft bei der Wiederherstellung des Sehprozesses und der optischen Kontrolle anderer Sinneswahrnehmungen Anwendung finden. Die Kombination von synthetischen Photoschaltern und Rezeptorproteinen erweitert das Feld der Optogenetik. Daraüber hinaus verleiht sie der chemischen Genetik eine neue Dimension, weswegen wir vorschlagen, diesen Forschungsansatz „optochemische Genetik“ zu nennen.

„The trick then is not to use the clumsy and inefficient techniques of classical organic chemistry by themselves but to make use of Nature's tools.“

„Der Trick ist demnach, nicht allein die klobigen und ineffizienten Techniken der klassischen organischen Chemie zu verwenden, sondern die Werkzeuge der Natur zu nutzen.“

Sir Francis Crick, 1999^[1]

1. Einleitung

Die molekularen Maschinen der Natur sind in ihrer Schönheit, Effizienz und Fähigkeit zur Integration in komplexe Systeme nicht zu übertreffen. Dies ist nicht überraschend, wenn man bedenkt, dass sie sich über Millionen von Jahren entwickelt haben. Im Unterschied dazu ist die organische Chemie als Fachgebiet erst ungefähr zweihundert Jahre alt. Die Synthese komplexer Moleküle hat kaum ein Drittel dieses Alters und ist weit davon entfernt, eine ausgereifte Technik zu sein. Dennoch hat die Synthesekemie während der letzten Jahrzehnte beachtliche Fortschritte gemacht und unzählige Moleküle hervorgebracht, die weder ein strukturelles noch ein funktionelles Gegenstück in der Natur haben.

Trotz allem liegen wir mit dem, was wir heute herstellen können, weit hinter der Natur zurück. Die Wirkstoffe, die wir synthetisieren, sind vergleichsweise einfache Moleküle, und

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	12363
2. Transmembranrezeptoren und ihre Rolle in der Neurobiologie	12364
3. Mehr Licht	12366
4. Optochemische Genetik	12368
5. Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle	12371
6. Lichtempfindliche spannungsgesteuerte Kaliumkanäle	12373
7. Ionotrope Glutamatrezeptoren	12375
8. Lichtempfindliche ionotrope Glutamatrezeptoren	12376
9. Pentamere ligandengesteuerte Ionenkanäle	12380
10. Lichtempfindliche pentamere ligandengesteuerte Ionenkanäle	12382
11. Eine Fülle von Targets	12382
12. Zusammenfassung und Ausblick	12386
13. Addendum (10. November 2011)	12387
14. Abkürzungen	12387

die molekularen Schalter, Motoren und Maschinen, die wir erfinden, sind konzeptionell recht beeindruckend, verblassen aber im Vergleich zu denen der Natur.^[2] Letztere hat man in den vergangenen Jahrzehnten mit diversen biophysikalischen Methoden im Detail erforscht, und unser Verständnis ihrer Funktionsweise hat sich enorm verbessert. Einige bekannte Beispiele molekularer Maschinen, die auf atomarer Ebene gut untersucht wurden, sind die ATP-Synthase,^[3] das Ribosom,^[4] die RNA-Polymerase,^[5] verschiedene molekulare Motoren^[6] und mehrere Ionenkanäle, die die Nervenaktivität kontrollieren.^[7] Obwohl diese Moleküle in einer Dimension operieren, in der quantenmechanische Effekte zum Tragen kommen, können sie oft mit recht einfachen und für Chemiker intuitiven mechanischen Modellen beschrieben werden.

[*] T. Fehrentz, M. Schönberger, Prof. D. Trauner
Department Chemie, Ludwig-Maximilians-Universität und Center for Integrated Protein Science
81377 München (Deutschland)
E-Mail: dirk.trauner@lmu.de

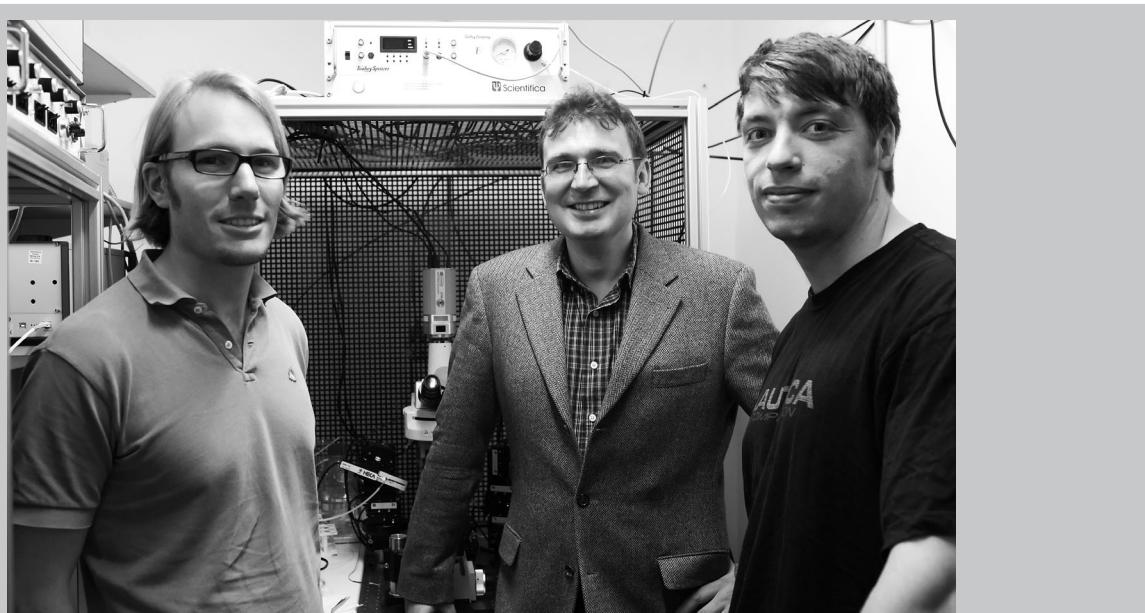
Unser stark verbessertes Verständnis der natürlich vorkommenden molekularen Maschinen ermöglicht es nun, ihre Funktionsweise mithilfe der Synthesechemie zu manipulieren. Genauso wie makroskopische Maschinen in ihre Einzelteile zerlegt und „auffrisiert“ werden können, können auch Nanomaschinen funktionell manipuliert und mit zusätzlichen Kontrollelementen ausgestattet werden. Diese Modifikationen können durch klassische Molekularbiologie, aber auch durch das Verknüpfen mit synthetischen Molekülen erreicht werden. Entscheidend ist hierbei, dass die Synthesechemie nicht alleine, sondern in Kombination mit den natürlichen Rezeptoren zum Tragen kommt. Eine solche Herangehensweise schafft Hybridmaschinen, die mit nichtnativen Stimuli kontrolliert und relativ einfach in hochkomplexe Systeme integriert werden können. Damit funktionieren sie nicht nur in isolierten Zellen, sondern auch in komplexen Nervengeweben und sogar in lebenden Tieren (d.h. *in vivo*).

In diesem Aufsatz wollen wir zeigen, wie eine solche Kombination von natürlich vorkommenden molekularen Maschinen und organischer Synthesechemie auf neurophysiologisch relevante Transmembranproteine angewendet werden kann. Zu diesem Zweck werden wir zunächst einen Überblick über die elementare Maschinerie der Sinneswahrnehmung, der synaptischen Übertragung und der neuralen Aktivität geben. Danach diskutieren wir, wie diese Maschi-

nerie so umprogrammiert werden kann, dass sie auf Licht reagiert und damit zur äußerst präzisen Untersuchung von neuronalen Netzwerken eingesetzt werden kann. Dies ist auch das Ziel der „Optogenetik“, einer rasant wachsenden, jungen Methode der Neurowissenschaften.^[8] Wir wollen hier zeigen, wie die Einführung einer chemischen Komponente das Repertoire der Optogenetik noch weiter vergrößert und wie diese Kombination als „optochemische Genetik“ bei der Analyse und funktionellen Erweiterung von Nervensystemen eingesetzt werden kann.^[9]

2. Transmembranrezeptoren und ihre Rolle in der Neurobiologie

Transmembranrezeptoren bilden die Grundlage der elektrischen und chemischen Kommunikation zwischen Nervenzellen. Für diesen Aufsatz definieren wir sie als Transmembranproteine, die auf Reizänderungen wie Änderungen der Lichtintensität, des Drucks, der Spannung, der Temperatur oder der Ligandenkonzentration reagieren. Zu solchen Rezeptoren zählen Ionenkanäle (ionotrope Rezeptoren), G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs, metabotrope Rezeptoren) und rezeptorgebundene Enzyme. Viele Jahre lang galten diese Proteine als schwer zu untersuchen, vor allem



Dirk Trauner (Mitte) wurde in Linz, Österreich geboren und verbrachte dort auch seine Schulzeit. Nach dem Studium der Biologie und Biochemie an der Universität Wien schloss er sich der Arbeitsgruppe von J. Mulzer an der FU Berlin an, um sich der Naturstoffsynthese zu widmen. Ende der 1990er Jahre war er als Postdoktorand für S. J. Danishefsky am Memorial Sloan-Kettering Cancer Center in New York City tätig. Im Jahr 2000 wechselte er an die University of California, Berkeley, wo er zum Associate Professor für Chemie aufstieg. 2008 wechselte er an die LMU München, wo er derzeit Professor für Chemische Biologie und Genetik ist.

Timm Fehrentz (links) studierte Chemie an den Universitäten Konstanz, Uppsala und Heidelberg. Seine Diplomarbeit fertigte er unter der Anleitung von P. H. Seeburg und J. Spatz am MPI für Medizinische Forschung in Heidelberg an. 2008 begann er bei D. Trauner an der LMU München zu promovieren. Einen Teil seiner Promotion absolvierte er im Labor von R. H. Kramer an der University of California, Berkeley. Seine Forschung beschäftigt sich mit der Entwicklung neuer PCL-Strategien in Hinblick auf verschiedene spannungsgesteuerte Ionenkanäle.

Matthias Schönberger (rechts) studierte biomedizinische Chemie an der Johannes Gutenberg Universität Mainz. Seine Diplomarbeit erfolgte am Brookhaven National Laboratory unter Anleitung von J. Fowler und J. Hooker und beschäftigte sich mit der Positronenemissionstomographie. Seit 2010 promoviert er mit Schwerpunkt optochemische Genetik bei D. Trauner an der LMU München. Matthias gehört der International Max Planck Research School of Life Science an und ist Stipendiat der Deutschen Studienstiftung.

durch Röntgenstrukturanalyse. Dies änderte sich schlagartig, als die Forschergruppe um MacKinnon 1998 die Kristallstruktur des K⁺-selektiven und pH-Wert-empfindlichen bakteriellen Kanals KcsA veröffentlichte.^[10] Seit dieser bahnbrechenden Arbeit wurden Vertreter nahezu aller Rezeptorklassen, z.B. GPCRs,^[11] ionotrope Glutamatrezeptoren (iGluRs),^[12] trimere ATP-Rezeptoren (P2X),^[13] spannungsgesteuerte Ionenkanäle^[14] und pentamere ligandengesteuerte Ionenkanäle (pLGICs)^[15] auf atomarer Ebene charakterisiert. Diese Rezeptoren sind in Abbildung 1 gezeigt und ihrer Symmetrie nach geordnet.

Mit Ausnahme von Rhodopsin^[11b] ist keiner der in Abbildung 1 gezeigten Rezeptoren lichtempfindlich. Drei Kandidaten – GluA2,^[12] P2X4^[13] und nAChR^[15a] – sind ligandengesteuerte Ionenkanäle, die auf Konzentrationsänderungen von Neurotransmittern oder extrazellulären Metaboliten reagieren. Spannungsgesteuerte Ionenkanäle wie K_v1.2 öffnen und schließen sich bei Änderungen des Transmembranpotentials.^[16] Sie können jedoch auch von Liganden wie Kanalblockern beeinflusst werden. Folglich können alle abgebildeten Rezeptoren auf die eine oder andere Weise mit-

hilfe kleiner Moleküle reguliert werden. Durch chemische Manipulation dieser Moleküle, die es ermöglicht, deren Aktivität mit Licht zu kontrollieren, könnte somit der gesamte Rezeptor-Liganden-Komplex in einen Photorezeptor umgewandelt werden.

Zunächst ist es jedoch sinnvoll, sich vor Augen zu führen, wie unsere Rezeptoren in die Generierung von Aktionspotentialen (APs) involviert sind.^[17] APs können mithilfe der Elektrophysiologie untersucht werden, einer ausgesprochen leistungsstarken Methode, die eine zeitliche Auflösung im Mikro- bis Millisekundenbereich ermöglicht. Die typische Form eines AP und eine schematische Darstellung eines Neurons sind in Abbildung 2 gezeigt. Ligandengesteuerte Ionenkanäle wie ionotrope Glutamatrezeptoren (im Zentralnervensystem, ZNS) oder nikotinische Acetylcholinrezeptoren (vor allem im peripheren Nervensystem) sind für die anfängliche Depolarisation der postsynaptischen Membran verantwortlich. Das Binden eines Neurotransmitters an den jeweiligen Kanal führt zu einer Öffnung der Kanalpore, was zu einem Natrium- und Kaliumionenstrom führt. Unter Berücksichtigung des Ruhepotentials der Nervenzelle und der

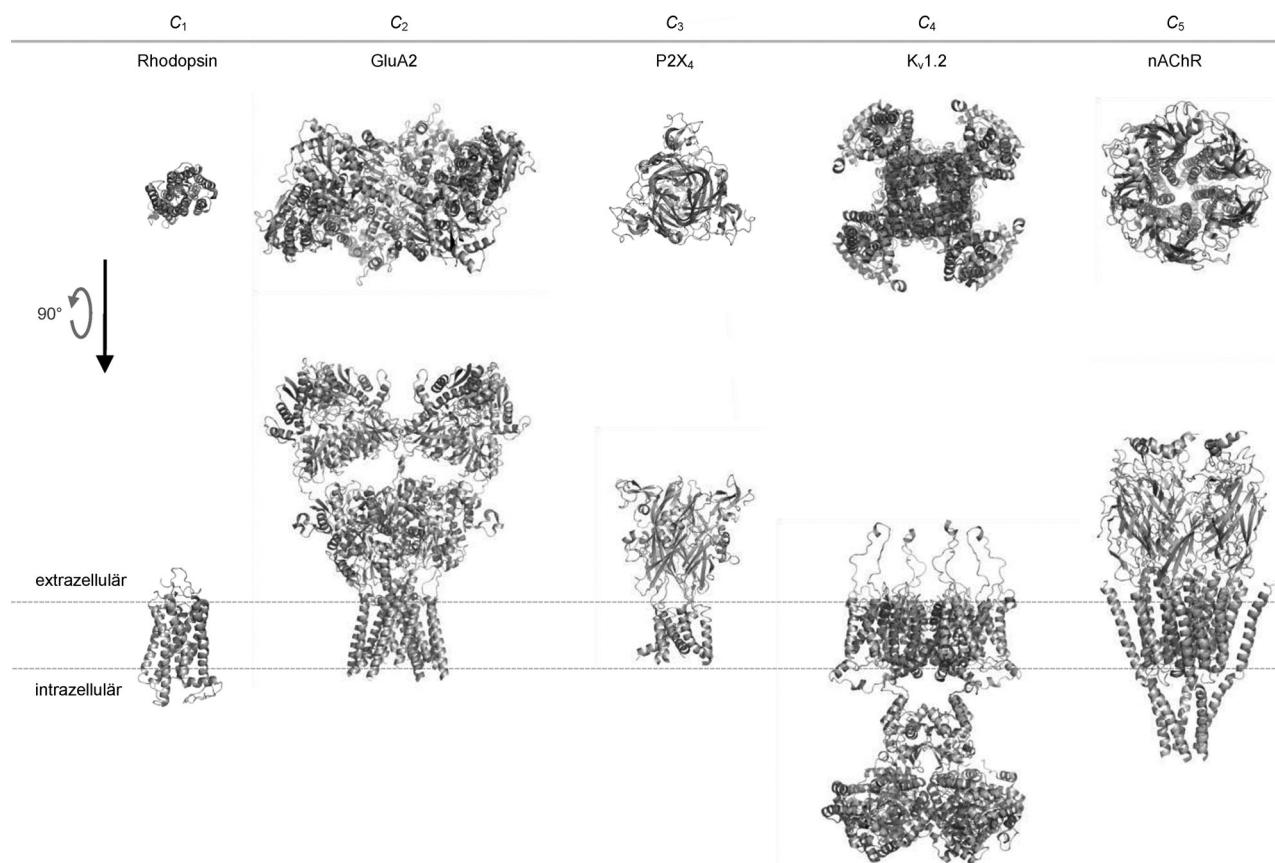


Abbildung 1. Transmembranrezeptoren unterschiedlicher Symmetrie, die mithilfe der Röntgenstrukturanalyse und Elektronenmikroskopie charakterisiert wurden. Jeder Rezeptor ist in einheitlichem Maßstab in Seitenansicht und Aufsicht (von der extrazellulären Seite) abgebildet. Von links nach rechts: Rhodopsin, ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor, der unseren Sehprozess ermöglicht (pdb-Code: 1U19). GluA2, ein glutamatgesteuerter Ionenkanal, der eine große Rolle in der exzitatorischen Neurotransmission spielt (pdb-Code: 3KG2). P2X₄, ein ATP-gesteuerter Kationenkanal, der in der Schmerzwahrnehmung involviert ist (pdb-Code: 3H9V). K_v1.2, ein spannungsgesteuerter Kaliumkanal, der zelluläre Erregbarkeit kontrolliert (pdb-Code: 3LUT). nAChR, ein nikotinischer Acetylcholinrezeptor, der die Kommunikation zwischen Neuronen und Muskelzellen ermöglicht (pdb-Code: 2BG9). Die gestrichelten Linien in dieser und anderen Abbildungen beschreiben die Grenzen zwischen dem Zellinneren, der Membran und dem Raum außerhalb der Zelle.

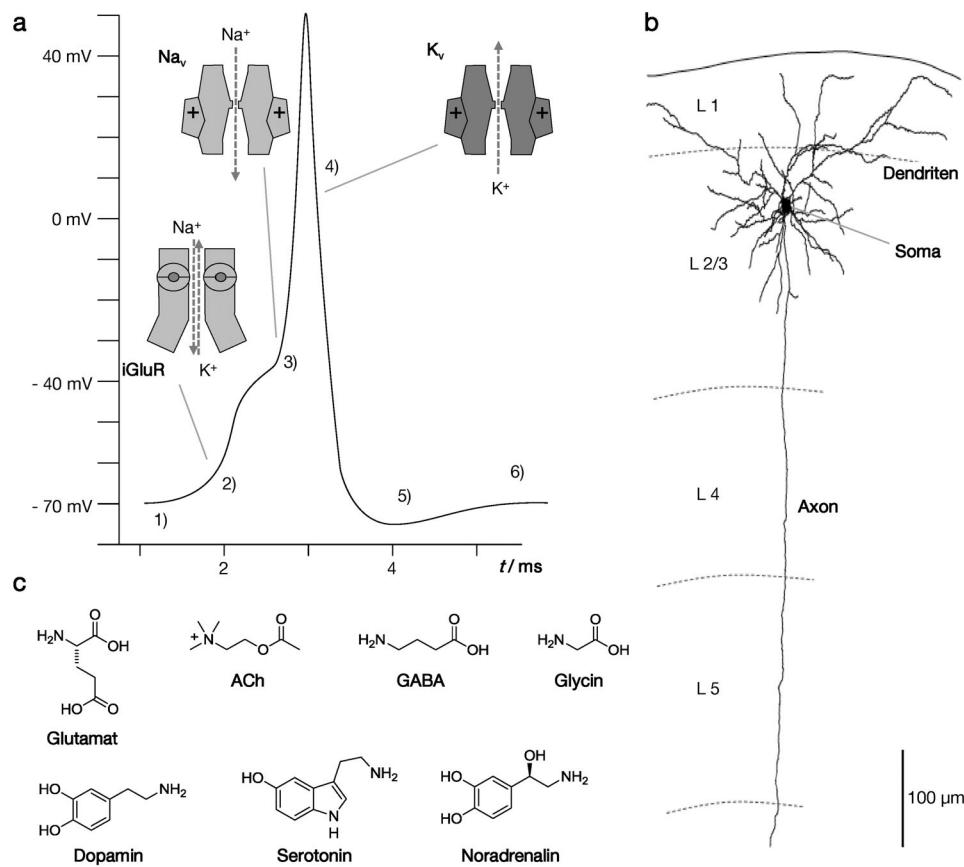


Abbildung 2. Überblick über die Neurotransmission. a) Das Aktionspotential: 1) Das Transmembranpotential eines Neurons im Ruhezustand; 2) ein Neurotransmitter bindet an einen ligandengesteuerten Ionenkanal, z. B. einen Glutamatrezeptor (iGluR), und ruft ein exzitatorisches postsynaptisches Potential hervor; 3) spannungsgesteuerte Natriumkanäle (Na_v) werden geöffnet, depolarisieren die Membran weiter und werden danach rasch inaktiv; 4) spannungsgesteuerte Kaliumkanäle (K_v) werden geöffnet und repolarisieren die Membran über das Ruhepotential hinaus (5); 6) Die Hyperpolarisation wird durch Ionenkanäle und -pumpen aufgehoben und das Ruhepotential wiederhergestellt. b) Ein repräsentatives Neuron des visuellen Cortex. Dendriten, Soma und Axon sind klar zu erkennen. Das Soma liegt in Ebene 2/3 (L2/3) und ist deutlich kürzer als das Axon, das verschiedene Ebenen des Cortex durchspannt. c) Die wichtigsten Neurotransmitter und Neuromodulatoren.

streng kontrollierten Verteilung von Natrium- und Kaliumionen führt dies effektiv zu einem Einfluss von positiver Ladung, was das Membranpotential verändert (Abbildung 2). Sobald dieses einen Wert von ca. -40 mV erreicht, öffnen sich spannungsgesteuerte Natriumkanäle. Durch den Einfluss von Natriumionen wird dann die Membran weiter depolarisiert, und das Membranpotential wird positiv (bis zu $+50 \text{ mV}$). Da sich die Natriumkanäle sehr zügig inaktivieren und Kaliumkanäle nach kurzer Verzögerung öffnen, wird die Nervenzelle jedoch schnell wieder repolarisiert. Sobald auch die Kaliumkanäle geschlossen sind, wird das Ruhepotential der Zelle durch Transporter und Pumpen, z. B. die Na/K -ATPase, wiederhergestellt.

Ionenkanäle können sowohl exzitatorische als auch inhibitorische Wirkung auf Neuronen haben, je nachdem ob sie das Membranpotential erhöhen oder verringern. Dies hängt nicht nur von der Ladung des durchtretenden Ions ab, sondern auch von dessen relativer Konzentrationsverteilung zwischen intra- und extrazellulärem Raum. Unter physiologischen Bedingungen haben daher unselektive Ionenkanäle und Natriumkanäle einen depolarisierenden Effekt, während Kaliumkanäle bei Öffnung reduzierend oder hyperpolarisierend wirken. Chloridkanäle, wie GABA_{A} - oder Glycinrezeptoren, wirken generell inhibitorisch auf neurale Aktivität.^[17a]

Außerdem gibt es auch Rezeptoren, denen eher eine modulatorische Rolle kommt und die die Form, Dauer und Frequenz von APs beeinflussen. Diese Rezeptoren können Ionenkanäle (z. B. KCNQ)^[18] oder (häufiger) G-Proteinkoppelte Rezeptoren (GPCRs) sein.^[17a, 19] Im Vergleich zu Ionenkanälen reagieren GPCRs langsam, da ihre Wirkung durch heterotrimere G-Proteine, Enzyme, sekundäre Botenstoffe, Transkriptionsfaktoren usw. vermittelt wird. Interessanterweise können die gleichen Neurotransmitter, z. B. Glutamat, Acetylcholin oder GABA, sowohl an ionotropen als auch an metabotropen Rezeptoren binden. Sogar Neuromodulatoren wie Serotonin, die primär metabotrope Rezeptoren adressieren, interagieren gelegentlich mit Ionenkanälen.^[20]

3. „Mehr Licht“

Unter den verschiedenen denkbaren Signalen, die einen Rezeptor aktivieren können, nimmt Licht aus mehreren Gründen eine Sonderstellung ein: Es kann in seiner Intensität innerhalb von Femtosekunden moduliert

werden, kann auf eine sehr kleine Fläche fokussiert werden (in der Größenordnung seiner Wellenlänge) und hat genug Energie, um aufwändige molekulare Bewegungen, z. B. Isomerisierungen, zu bewerkstelligen. Damit ist Licht in seiner zeitlichen und räumlichen Präzision unübertroffen und prädestiniert, molekulare Maschinen, Werkzeuge und Netzwerke (d. h. auch Nervensysteme) „fernzusteuern“.

Licht wurde von Lebewesen seit Urzeiten dazu eingesetzt, Information aus der Umgebung zu gewinnen. Visuelle Systeme entstanden in der Tat auf fast allen Ebenen der Evolution und wurden durch menschliche Technologie, z. B. in Form von Mikroskopie, stark weiterentwickelt. Die Mikroskopie ist weiterhin ein sehr aktives Forschungsfeld, in dem fortlaufend neue bildgebende Verfahren entwickelt werden. Beispiele dafür aus jüngerer Zeit sind die superauflösende Mikroskopie^[21] und die Zweiphotonennmikroskopie.^[22] Als Folge dieser technischen Fortschritte können Neurone nun in beeindruckendem Detail aufgelöst werden. Des Weiteren können APs mit fluoreszierenden Calciumsensoren sichtbar gemacht

werden, und Aktivität lässt sich in neuralen Netzwerken *in vivo* mit guter Zeitauflösung beobachten.^[23]

Licht eröffnet aber auch die Möglichkeit, Information in ein System zu übertragen – vorausgesetzt, es gibt entsprechende Photorezeptoren. Wie in der Bildgebung kann dies mit hervorragender zeitlicher und räumlicher Präzision erfolgen. Die methodischen Voraussetzungen sind weitgehend identisch. Sofern die Intensität nicht zu hoch und die Wellenlänge nicht zu kurz sind, kann der Einsatz von Licht mit minimaler Gewebschädigung durchgeführt werden, zumindest gegenüber dem invasiven Einsetzen mehrerer Elektroden in elektrophysiologischen Experimenten. Der Nutzen von Licht als Stimulus in der Neurowissenschaft wurde von niemand geringerem als Sir Francis Crick erkannt, der 1999 schrieb: „*The ideal signal [to study and control a brain] would be light, probably at an infrared wavelength to allow the light to penetrate far enough. This seems rather far-fetched but it is conceivable that molecular biologists could engineer a particular cell type to be sensitive to light in this way*“ (“Das ideale Signal [um ein Gehirn zu studieren und zu kontrollieren] wäre Licht, und zwar am besten von einer Wellenlänge, die tiefes Eindringen ermöglicht. Es mag ein wenig weit hergeholt klingen, aber es ist durchaus vorstellbar, dass Molekularbiologen einen bestimmten Zelltyp so konstruieren könnten, dass er derart lichtempfindlich würde.”).^[1]

Es dauerte nicht lange, bis sich Molekularbiologen dieser Herausforderung stellten, was letztlich zum neuen Forschungsgebiet der Optogenetik („Optogenetics“) führte.^[8a,b] Im Wesentlichen versucht die Optogenetik, neurale oder zelluläre Aktivität durch genetisch kodierte Photorezeptoren zu kontrollieren. Durch ihre genetische Komponente lässt sich Lichtempfindlichkeit in bestimmten Zellen lokalisieren. Damit ist es nicht nötig, den Lichtstimulus mit hoher Auflösung im Gewebe zu fokussieren, und Lichtstreuung ist, zumindest verglichen mit der Situation in der Mikroskopie, ein geringes Problem.

Die Photosensibilisierung inhärent „blinder“ Neuronen mithilfe von künstlichen Photorezeptoren lässt sich auf verschiedene Weise erreichen. Historisch war „ChARGE“, das aus den primären Komponenten der visuellen Kaskade von *Drosophila* besteht (Rhodopsin, das dazugehörige G-Protein und Arrestin), das erste erfolgreich eingesetzte System.^[24] Nach heterologer Expression in hippocampalen Neuronen kann dieses Mehrkomponentensystem bei Lichteinstrahlung APs auslösen. Kurz darauf folgte SPARK, ein frühes optochemisches Verfahren, auf das wir im Verlauf dieses Aufsatzes noch näher eingehen werden. 2004 wurde der natürliche Photorezeptor Kanalrhodopsin-2 (ChR2) zum ersten Mal für die reversible Kontrolle von neuraler Aktivität genutzt, was sich seither als die praktischste und populärste Methode etabliert hat (Abbildung 3).^[25] ChR2 ist ein exzitatorischer Ionenkanal, der aus der Alge *Chlamydomonas reinhardtii* isoliert wurde.^[25a] Blaues Licht aktiviert den Kanal, während er im Dunkeln automatisch inaktiviert. Diese Prozesse sind sehr schnell und reversibel und somit bestens für den Einsatz in der Neurobiologie geeignet.^[25b] Wie bei den Rhodopsinen ist Retinal hier der Photoschalter, doch im Unterschied zu den Sehpigmenten der Säugetiere wird es nach dem Photoschalten nicht hydrolysiert, was den Schalt-

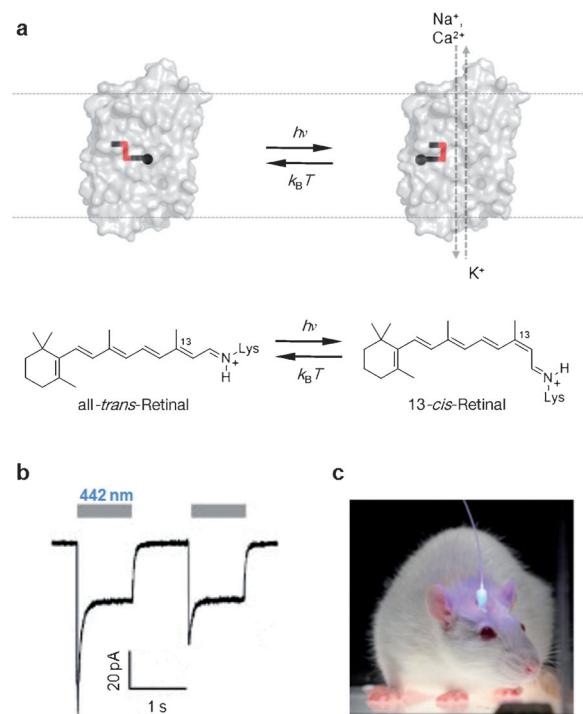


Abbildung 3. Optogenetik. a) Schematische Darstellung von ChR2, einem lichtgesteuerten Ionenkanal. Der Chromophor 13-trans-Retinal (hier als konjugierte Schiff-Base gezeigt) isomerisiert mit blauem Licht, gefolgt von thermischer Relaxation, was den Kanal steuert. b) Beleuchtung von ChR2 mit blauem Licht führt zu Depolarisation. c) Das Verhalten einer Maus wird mit blauem Licht kontrolliert. Ein Glasfaserkabel versorgt tiefliegendes Hirngewebe mit Licht.

prozess von ChR2 reversibel macht. Als zusätzlicher Vorteil wird Retinal in vielen Geweben endogen produziert und muss folglich nicht extern zugeführt werden.^[26]

Kurz nach dem exzitatorischen Photorezeptorkanal ChR2 wurde ein inhibitorisches Pendant, eine lichtgetriebene Chloridpumpe mit dem Namen *Natromonas-pharaonis*-Halorhodopsin (NpHR), vorgestellt.^[27] NpHR wird mit gelbem Licht aktiviert und ermöglicht die Hemmung neuraler Aktivität mit einer Auflösung im Millisekundenbereich. Durch ihre geringe spektrale Überlappung können ChR2 und NpHR gleichzeitig in demselben Neuron exprimiert und unabhängig voneinander stimuliert werden.^[8b,27] Varianten von ChR2 und NpHR mit modifizierten spektralen und kinetischen Eigenschaften werden weiterhin entwickelt,^[28] und auch andere genetisch kodierbare Systeme wie die kürzlich entdeckten lichtgesteuerten Protonenpumpen ermöglichen eine höchst präzise Steuerung neuraler Aktivität mit Licht.^[29]

Seit dem Beginn des neuen Jahrtausends hat die Optogenetik mehrfach Anwendung bei der Entschlüsselung neuraler Schaltkreise gefunden und hat damit geholfen, fundamentale neurobiologische Fragen zu beantworten. Als Zeugnis ihrer enthusiastischen Aufnahme in der Wissenschaft wurde die Optogenetik als „Methode des Jahres 2010“ ausgezeichnet.^[8a,c] Über ihre Rolle in den Grundlagenwissenschaften hinaus hat die Optogenetik bereits erste Anwendungen in der klinischen Forschung gefunden. ChR2 und NpHR wurden z. B. genutzt, um den Wirkmechanismus tiefer

elektrischer Hirnstimulation zu untersuchen, die die Symptome von Morbus Parkinson mildern kann.^[30] Eine zweite Studie konzentrierte sich auf Retinitis Pigmentosa, eine Krankheit, die den Verlust von Photorezeptorzellen in der Retina bewirkt. Hier konnte die Lichtempfindlichkeit der verbleibenden Retina durch Expression von NpHR in bestimmten Zellen wiederhergestellt werden. Dies ermöglichte erblindeten Mäusen, visuell gesteuertes Verhalten zu zeigen.^[31] In einer weiteren Anwendung von ChR2 und NpHR konnten Schrittmacherzellen des Herzens von Zebrafischen optisch stimuliert oder gehemmt werden, was die Kontrolle von Herzschlagmustern ermöglichte.^[32]

4. Optochemische Genetik

Erstaunlicherweise lassen sich die Werkzeuge der Optogenetik, die hauptsächlich von Bakterien und Protozoen abgeleitet sind, gut in das Nervensystem von Würmern, Fliegen und sogar höheren Tieren einsetzen. Deren Neurone sind von Natur aus mit zahlreichen Rezeptoren ausgestattet, die leicht zugänglich, aber nicht inhärent lichtempfindlich sind. Die Frage ist, wie man solche endogenen Rezeptoren dazu „überreden“ kann, auf Licht zu reagieren.

Drei generelle Strategien haben sich etabliert, mit denen man genau dies unter Zuhilfenahme kleiner synthetischer Moleküle erreichen kann (Abbildung 4). Die einfachste und älteste Vorgehensweise nutzt photoaktivierbare Moleküle (caged ligands, CLs), die man auch als „Liganden hinter Gittern“ bezeichnen könnte.^[33] Hier wird ein Ligand mit einer Schutzgruppe versehen, die ihn pharmakologisch inaktiv macht. Diese Schutzgruppe ist weniger ein molekularer Käfig, sondern vielmehr eine photolabile Einheit, die eine für die Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung essenzielle funktionelle Gruppe des Liganden maskiert. Durch photochemische Abspaltung der Schutzgruppe wird der aktive Ligand dann freigesetzt und kann den gewünschten biologischen Effekt auslösen.

Photoaktivierbare Moleküle gehören heutzutage zum Standardrepertoire der Neurobiologie. Einer ihrer wichtigsten Vertreter ist das photoaktivierbare Glutamat, das schon oft zur Aufklärung neuraler Fragen genutzt worden ist und im Falle von Zweiphotonenanregung auch an einzelnen Synapsen eingesetzt werden kann.^[34] Die Photosensibilisierung von P2X₂-Rezeptoren und TRPV1-Kanälen mithilfe von photoaktivierbarem ATP bzw. Capsaicin gehört zu den ersten Versuchen, neurale Aktivität *in vivo* zu steuern.^[35]

Photoaktivierbare Moleküle haben jedoch gewisse Nachteile. Dazu zählt, dass die photochemische Spaltung irreversibel ist. Des Weiteren ist der Ligand in der Freisetzungszone meist längere Zeit präsent, sofern er nicht von einer Pumpe oder einem Enzym entfernt bzw. abgebaut wird. Dies führt häufig zu lang anhaltenden (tonischen) Effekten, die in der Regel unerwünscht sind. Eine Ausnahme ist z. B. der Ligand Glutamat, der aktiv aus dem synaptischen Spalt entfernt wird. Für die meisten selektiven synthetischen Agonisten und Antagonisten trifft dies aber nicht zu. Darüber hinaus können Nebenprodukte der Entschüttung wie Überreste der Schutzgruppe toxisch wirken. Die Hintergrundfrei-

setzung des Neurotransmitters durch z.B. thermische Hydrolyse kann ein Problem sein, ebenso wie die Tatsache, dass manche photoaktivierbare Moleküle Nebeneffekte wie antagonistische Wirkung an anderen Rezeptoren haben können.

Einige dieser Nachteile können durch die Verwendung photochromer Liganden (PCLs) überwunden werden. Hier trägt der Ligand eine photoschaltbare Seitenkette, die zwischen zwei Konfigurationen mit unterschiedlicher Ligandenaffinität hin- und hergeschaltet werden kann. Indem der Photoschalter abwechselnd einen der beiden Zustände einnimmt, ändert sich die biologische Effizienz des Liganden, was den biologischen Effekt reversibel macht. Denkbar wäre sogar, dass der Photoschalter in der einen Konfiguration als Agonist und in der anderen als Antagonist wirkt.

PCLs haben alle Vorteile von niedermolekularen Wirkstoffen, einschließlich ihrer einfachen Applikation und schnellen Verteilung im Gewebe. Genauso wie bei Arzneistoffen kann die Selektivität zwischen Rezeptorsubtypen ein Problem sein, was allerdings oft durch systematische Variation des Moleküls bewältigt werden kann. Hinzukommend könnte man die Sorge haben, dass die Photoisomere relativ kleine Unterschiede in ihrer Wirksamkeit haben. Unserer Erfahrung nach funktionieren PCLs jedoch ausgesprochen gut in komplexen Systemen wie neuronalen Netzwerken. Dabei können kleine Änderungen in der Aktivität eines Modulators drastische Auswirkungen haben. Beispielsweise ist das AP eine „alles oder nichts“-Antwort, die nur ausgelöst wird, nachdem ein bestimmter Schwellenwert in einer komplexen zellulären Integration erreicht wurde. Dementsprechend können PCLs, die den Prozess der Integration auf subtile Weise beeinflussen, recht ausgeprägte Effekte haben.

Natürlich gibt es auch Fälle, bei denen hohe Selektivität zwischen Rezeptorsubtypen oder verschiedenen Zelltypen erwünscht ist. In diesem Fall kann eine dritte Methode, die wir „photoschaltbare angeleinte Liganden“ (photoswitchable tethered ligands, PTLs) nennen, verwendet werden. Hier ist der Ligand kovalent über eine „Leine“, die einen Photoschalter enthält, an den Rezeptor gebunden. Indem dieser Schalter lichtabhängig zwischen einer langen und kurzen Form hin- und hergeschaltet wird, verändert sich die lokale Konzentration und/oder die Effizienz des angeleinten Liganden. Dies ermöglicht es, auf reversible Art biologische Effekte auszulösen. PTLs können genetisch kodiert werden, da der Anknüpfungspunkt in der Regel ein artifiziell eingebrachtes Cystein ist. Weil der PTL kovalent angebunden ist, ist seine lokale Konzentration in der aktiven Form des Photoschalters sehr hoch, was auch bedeutet, dass die Affinität des freien Liganden keine besonders große Rolle spielt. Tatsächlich sind weniger affine Liganden bevorzugt, um sicherzustellen, dass das Photoschalten den Liganden aus der Bindungstasche wieder entfernen kann.

Die PTL-Methode ist eine Variante der Optogenetik, da sie einen genetisch kodierbaren Rezeptor mit Lichtaktivierung kombiniert, um damit neurale Aktivität zu kontrollieren. Im Unterschied zur „klassischen“ Optogenetik wird hier jedoch eine synthetische Komponente, d.h. eine reaktive chemische Substanz, benötigt, die nicht endogen produziert wird. Die PCL- und CL-Strategien hingegen sind eher mit der „chemischen Genetik“ verwandt.^[36] Bei diesem Ansatz ver-

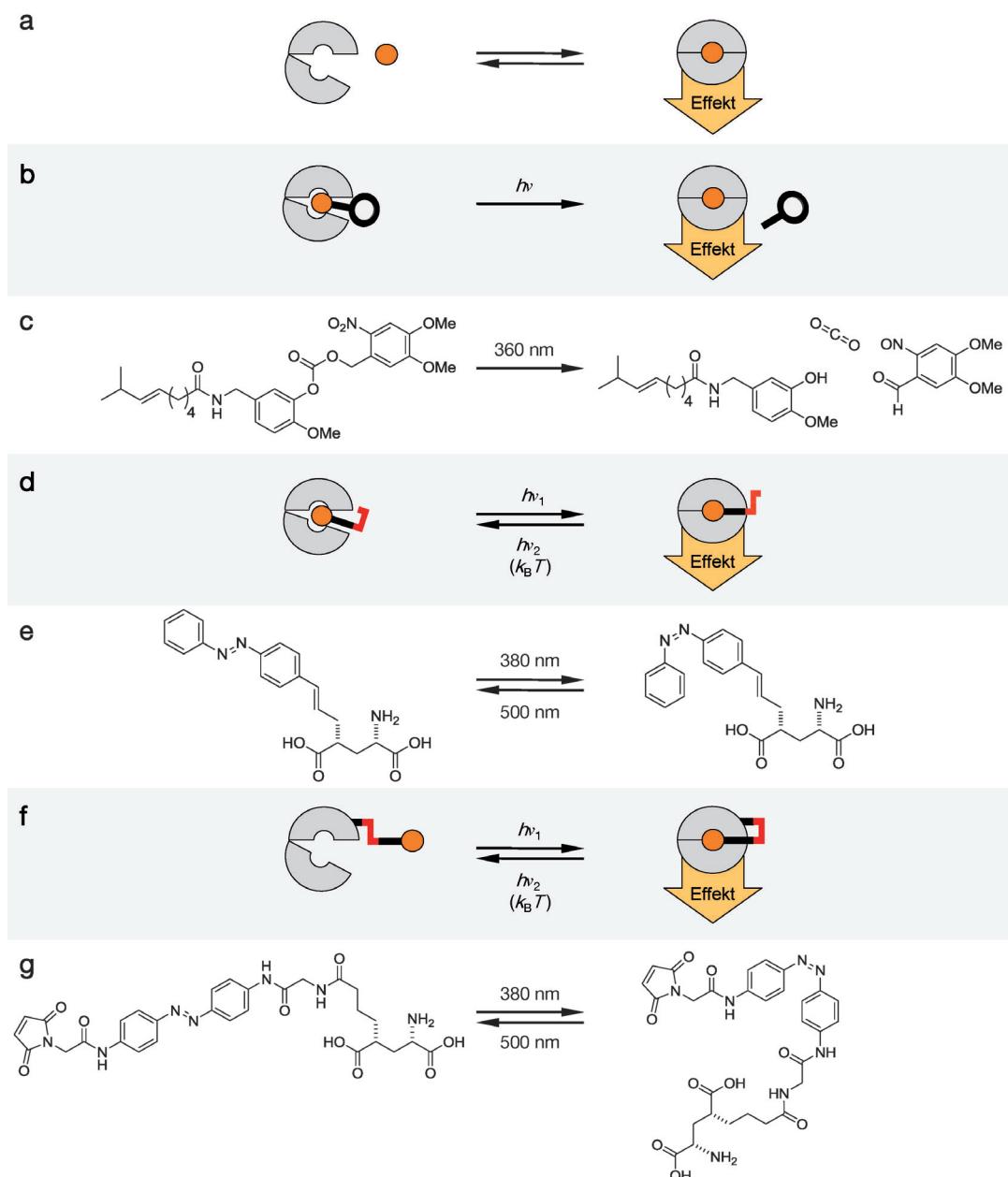


Abbildung 4. Drei Strategien der optochemischen Genetik. a) Ein Ligand bindet an einen allgemeinen Rezeptor (nicht notwendigerweise ein muschelschalenartiger Rezeptor, wie hier angedeutet) und induziert eine biologische Antwort. b) Ein photoaktivierbares Molekül (CL) wird mit Licht gespalten und lässt die aktive Form frei. c) Photoaktivierbares Capsaicin dient zur Stimulierung von TRPV1 Kanälen. d) Ein photochromer Ligand (PCL) wechselwirkt reversibel mit einem Rezeptor. e) 4-GluAzo, ein PCL, der als „reversibles photoaktivierbares Glutamat“ agiert. f) Ein kovalent gebundener photoschaltbarer Ligand (PTL) kann einen Rezeptor optisch regulieren. g) MAG-1, ein typischer PTL in nichtkonjugierter Form.

sucht man, zu jedem Protein des Genoms einen selektiven Liganden zu finden. Obwohl der gewünschte pharmakologische Effekt recht schnell einsetzen kann, ist er dennoch für viele Anwendungen in der Neurobiologie, in der häufig Millisekundenpräzision vonnöten ist, zu langsam. Diese Einschränkung kann dadurch überwunden werden, dass die Liganden unter Lichtkontrolle gestellt werden.

Zusammengenommen bilden die CL-, PCL- und PTL-Methoden die Basis dessen, was wir „optochemische Genetik“ nennen. Dabei handelt es sich um einen Versuch, neurale Aktivität (oder jede beliebige Netzwerkaktivität) mit Licht

und lichtempfindlichen synthetischen Molekülen zu kontrollieren, und zwar mit oder ohne eine genetisch determinierte Komponente. Mit der chemischen Genetik teilt die optochemische Genetik bis zu einem gewissen Grad das Bestreben, die Nachteile konventioneller genetischer Manipulation zu überwinden, sie nutzt aber manchmal auch die gezielte Expression von Proteinen, deren Vorteile nicht zu leugnen sind.

Welche Variante eingesetzt wird, hängt von der exakten Fragestellung ab. Für therapeutische Anwendungen, bei denen geringe Selektivität toleriert werden kann oder sogar wünschenswert ist,^[37] stellt der PCL-Ansatz zweifellos die

Methode der Wahl dar. Andererseits bieten PTLs die Möglichkeit der Kartierung neuraler Schaltkreise mithilfe gezielter genetischer Transfektion bestimmter Zellen. Der entscheidende Vorteil, den die PTL-Strategie gegenüber allen anderen optogenetischen Methoden hat, liegt aber in der selektiven Pharmakologie, die sie ermöglicht. Wegen der Ähnlichkeit von Rezeptorsubtypen ist es häufig unmöglich, ihre individuelle physiologische Rolle mit traditioneller Pharmakologie festzulegen. Durch den PTL-Ansatz kann aber genau das erreicht werden, da die Selektivität durch die kovalente Verknüpfung mit genetisch determinierten Isoformen sichergestellt wird (Abbildung 5). Insgesamt hat der PTL-Ansatz zur selektiven Pharmakologie eine gewissen

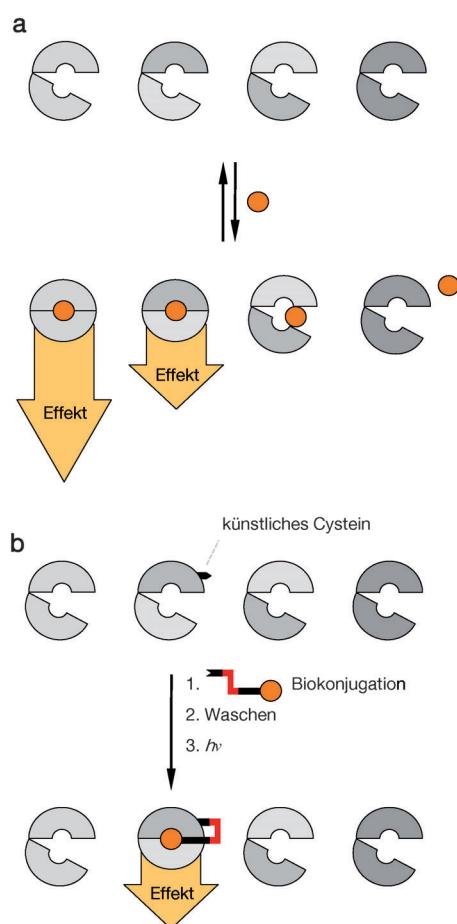


Abbildung 5. Der PTL-Ansatz zur selektiven Pharmakologie. a) Chemische Genetik und Pharmakologie zielen generell darauf ab, individuelle Rezeptoren und Isoformen anzusprechen. Dies benötigt Liganden, die mit hoher Affinität und Selektivität binden. b) Mit optochemischer Genetik kann diese Selektivität durch genetisch determinierte Biokonjugation erzielt werden. Zusätzlich kann der photoaktive Ligand sogar geringe Affinität zum Rezeptor haben.

Ähnlichkeit mit der Bump-Hole-Technik, die so erfolgreich bei der Aufklärung des menschlichen Kinoms, also der Summe aller menschlichen Kinasen, genutzt wurde.^[38] In beiden Fällen werden genetisch modifizierte Proteine benötigt, und bei der Bump-Hole-Strategie kommt ein zusätzlicher, orthogonaler Ligand hinzu. Die PTL-Methode liefert

aber nicht nur eine präzise Antwort auf die Frage nach dem „wer“, sondern auch nach dem „wann“ und „wo“.

Photoaktivierbare Moleküle wurden hauptsächlich von anderen Forschungsgruppen entwickelt und bereits ausgiebig besprochen,^[33] weswegen sich unsere Diskussion hier auf synthetische Photoschalter, d.h. auf PTLs und PCLs, konzentriert. Unter den verschiedenen denkbaren molekularen Photoschaltern haben sich die Azobenzole als die vielfältigsten und verlässlichsten herausgestellt.^[39] Dies liegt an mehreren funktionellen und strukturellen Merkmalen, die Azobenzole von anderen Schaltern unterscheiden. Zum Beispiel ist die Geometrie der *cis*- und *trans*-Isomere gut definiert, und der Konformationsraum, den die Isomere einnehmen können, überlappt nur wenig. Substituenten in 4- und 4'-Position sind sich in der *cis*-Form wesentlich näher als in der *trans*-Form, ein Effekt, der durch entsprechende Substitution des Azobenzols weiter verstärkt werden kann. Azobenzole sind in ihrer *cis*-Form, die nicht planar, sondern helikal-chiral ist, wegen schneller Racemisierung typischerweise nicht optisch aktiv. Hinzu kommt, dass sie keine Stereozentren durch das Schalten zwischen der *trans*- und *cis*-Form generieren.

Azobenzole weisen zudem hohe Extinktionskoeffizienten und Quantenausbeuten auf, weswegen man sie auch bei relativ geringer Lichtintensität photoisomerisieren kann. Darüber hinaus verläuft das Photoschalten von Azobenzolen äußerst schnell, was die Bildung von Tripletdiradikalen verhindert. Diese würden mit Tripletsauerstoff reagieren und Singuletsauerstoff bilden, bei dem es sich um eine hochreaktive und zytotoxische Spezies handelt. Dabei könnte es auch zur Schädigung der Chromophore selbst kommen. Die relativ große Photostabilität der Azobenzole ermöglicht es daher, sie über viele Zyklen zu schalten. Ihre spektrale Manipulation durch entsprechende Substitution ist relativ einfach und folgt gut bekannten Regeln. Während die meisten derzeit verwendeten Azobenzole mit UV-A- oder tief violettem Licht (315–380 nm) in ihre *cis*-Form geschaltet werden, sind rotverschobene Versionen, die bei längerer Anwendung in Gewebe weniger schädlich sind, ebenfalls bekannt (siehe Abschnitt 6). Letztlich sind Azobenzole vergleichsweise einfach herzustellen und zu modifizieren, da verschiedene Synthesestrategien einschließlich Diazoniumkupplung, Mills-Reaktion und Übergangsmetall-katalysierte Kreuzkupplungen verfügbar sind.^[40] Ein möglicher Nachteil ist ihre relativ geringe Löslichkeit in Wasser, die allerdings in den meisten Fällen durch entsprechende Substitution, vor allem mit geladenen Substituenten, behoben werden kann. Wichtig ist, dass die photostationären Zustände der Azobenzole eine Funktion der Wellenlänge sind. Während die Moleküle zu 100 % in der thermodynamisch stabileren *trans*-Form vorliegen können (im dunkel-adaptierten Zustand) und ihr photostationäres *cis/trans*-Verhältnis bei kleinen Wellenlängen das Verhältnis 9:1 übertreffen kann (Abbildung 6),^[41] ist es praktisch unmöglich, sie durch Bestrahlung vollständig in den *cis*-Zustand zu überführen. Daher ist die Hintergrundaktivität des *trans*-Isomers in Betracht zu ziehen, was allerdings angesichts der oben aufgeführten Eigenheiten neuraler Netzwerke meist ein geringes Problem ist. Die thermische Bistabilität von Photoschaltern kann durch ent-

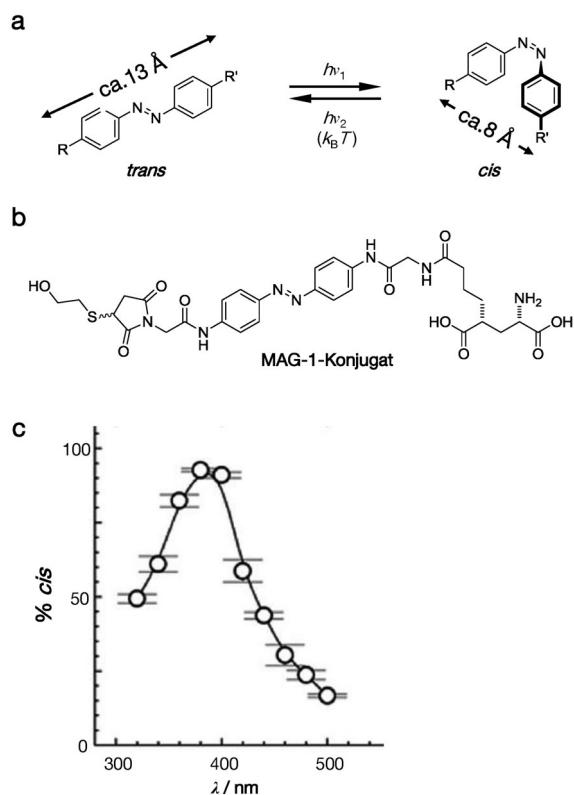


Abbildung 6. Die Logik von Azobenzolphotoschaltern. a) Azobenzole ändern ihre Konfiguration und Länge bei Bestrahlung mit verschiedenen Wellenlängen. Sie kehren thermisch oder photochemisch in ihre thermodynamisch stabilere Form zurück, typischerweise die *trans*-Form. b) Das Mercaptoethanolkonjugat von MAG-1 als Modell für den kovalent gebundenen PTL. c) Das photostationäre *cis/trans*-Verhältnis des MAG-1-Konjugats als Funktion der Bestrahlungswellenlänge.

sprechende Substitution weiter beeinflusst werden. PTLs, bei denen ein Ende des *cis*-Azobenzols kovalent mit dem Protein interagiert, relaxieren typischerweise langsam (zumindest auf einer neurobiologischen Zeitskala). Im Unterschied dazu relaxieren einige rotverschobene PCLs innerhalb von Millisekunden in ihren dunkel-adaptierten Zustand.^[42]

Sobald man sich für einen Photoschalter entschieden hat, ist das Design der PCLs und PTLs unkompliziert, sofern es Strukturdaten für den Rezeptor und/oder umfassende Struktur-Aktivitäts-Beziehungen für den Liganden gibt. Letzteres ist häufig der Fall, denn die Neuropharmakologie ist ein gut entwickeltes Feld. Man kann sich heutzutage auch nicht über einen Mangel an Ersterem beklagen, denn relevante Strukturen tauchen fast wöchentlich in der Literatur auf.

Das Design von PCLs und PTLs geht Hand in Hand und beginnt typischerweise mit einer Ligandenstruktur, die der strukturbiologischen oder pharmakologischen Literatur entnommen wird. Anhand dieser Daten ist es meist offensichtlich, wie der Photoschalter mit dem Liganden verknüpft werden muss und welche Konfiguration an dem Anknüpfungspunkt gewählt werden sollte. Häufig bietet sich die Synthese eines so genannten „Testmodells“ (tether model) an, das einen Phenylring des Azobenzols enthält und mit dem sich die pharmakologische Verträglichkeit des erweiterten Li-

ganden untersuchen lässt. Nach erfolgreicher Charakterisierung wird der Ligand zu einem vollständigen PCL, der den gesamten Chromophor enthält, verlängert. Ein PTL kann durch Einführung einer elektrophilen Gruppe erzeugt werden. Im Allgemeinen reichen umfangreiche Daten zur Struktur-Wirkungs-Beziehung aus, um PCLs mit einer guten Erfolgsschance zu entwerfen, während für PTLs normalerweise Kristallstrukturen nötig sind. Der PTL-Ansatz benötigt reaktive Cysteine, und deren Positionsermittlung kann ohne Strukturkoordinaten sehr schwierig sein. In diesen Zusammenhang kommen immer häufiger speziell hierfür entworfene Computerprogramme zum Einsatz.

Da es sich bei PTLs meist um cysteinreaktive Verbindungen handelt, könnte man sich Sorgen wegen unspezifischer Bindungen machen. Man sollte aber bedenken, dass freie Cysteine auf der Zelloberfläche vergleichsweise selten sind. Hinzu kommt, dass die nichtkovalente Interaktion des PTLs mit seiner Bindungsstelle meist der kovalenten Bindungsbildung vorausgeht, was die Geschwindigkeit und Selektivität des Markierens erhöht. Außerdem sind Zellen recht tolerant gegenüber Molekülen, die an ihrer Oberfläche hängen, solange sie keine wichtigen Zell-Zell-Interaktionen beeinträchtigen.^[43]

Das Design von PTLs und PCLs ist eng mit ihrer Synthese verzahnt. Manchmal ist diese Synthese der Photoschalter enorm anspruchsvoll, da die Chemie der Photoschalter mit der Chemie polarer und geladener Liganden kompatibel sein muss, was häufig komplexe Schutzgruppenoperationen erfordert. Bei der Synthese von PTLs wird dementsprechend eine späte Einführung des Elektrophils in das Molekül bevorzugt. Die Synthesen müssen praktisch und effizient genug sein, um langwierige biologische Studien zu tragen, die *In-vivo*-Versuche und letztlich auch Verhaltensstudien von Tieren umfassen können.

In den folgenden Abschnitten zeigen wir, wie die optochemische Genetik auf einige der wichtigsten in der synaptischen Transmission involvierten molekularen Maschinen angewendet werden kann, nämlich auf spannungsgesteuerte Kaliumkanäle und ionotrope Glutamatrezeptoren. Dazu geben wir jeweils zunächst eine allgemeine Einführung in ihre Funktionsweise und Rolle im Nervensystem. Anschließend wird beschrieben, wie diese Rezeptoren mit kovalent oder nichtkovalent verknüpften Azobenzolphotoschaltern in Hybridphotorezeptoren überführt werden können. Danach widmen wir uns anderen Zielstrukturen, z.B. nAChR und dem P2X₄-Rezeptor, bei denen dies ebenfalls bereits bis zu einem gewissen Grade gelungen ist. Zum Abschluss werfen wir noch einen Blick auf einige Rezeptoren, die noch nicht in Photorezeptoren überführt wurden, aber bald an der Reihe sein dürften.

5. Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle

Spannungsgesteuerte Natrium- (Na_v) und Kaliumkanäle (K_v) tragen entscheidend zur Kontrolle des neuralen Membranpotentials bei und bestimmen damit den Ablauf von Aktionspotentialen.^[17c] K_v -Kanäle sind tetramere Transmembranproteine, die sich aus vier Polypeptidketten, so ge-

nannten α -Untereinheiten, zusammensetzen. Im menschlichen Genom kodieren 40 Gene zwölf α -Untereinheitsfamilien (K_v1-K_v12).^[44] Diese Diversität wird durch Kombination von verschiedenen α -Untereinheiten noch erhöht, was eine sehr große Zahl möglicher K_v -Kanäle ergibt. Hinzu kommt, dass einige Mitglieder der K_v1 -Unterfamilie intrazellulär mit β -Untereinheiten assoziieren, die den Vorgang der Kanalöffnung beeinflussen.^[45]

Bisher wurden mehrere Kaliumkanäle durch Röntgenstrukturanalyse auf atomarer Ebene aufgeklärt. Den Anfang machte KcsA, ein vergleichsweise einfacher bakterieller Kanal aus *Streptomyces lividans*, dessen Veröffentlichung 1998 ein Meilenstein der Biophysik ist.^[10] In den folgenden Jahren wurden die Strukturen eines calciumaktivierten Kaliumkanals (MthK),^[46] mehrerer Einwärts-Gleichrichter-Kaliumkanäle (z.B. $K_{ir}3.1$),^[47] eines natrium- und kaliumpermeablen Kanals (NaK)^[48] sowie die Strukturen mehrerer prokaryotischer und eukaryotischer spannungsgesteuerter Kanäle veröffentlicht.^[14b, 16] Die Struktur des in Abbildung 7 gezeigten $K_v1.2$ -Kanals zeigt die Spannungssensoren, die Kanalpore, den inneren Hohlraum und das äußere Vestibül. [Die β -Untereinheiten sind hier nicht abgebildet, jedoch sichtbar in Abbildung 1.^[14b]] Jede α -Untereinheit umfasst

eine intrazelluläre Tetramerisierungsdomäne, einen Spannungssensor (bestehend aus Helices S1–S4) und eine Porendomäne (Helix S5, kurze Porenhelix, Porenschleife und die C-terminale Helix S6).^[44] Sowohl der N- als auch der C-Terminus befinden sich im Cytosol, wobei der N-Terminus in der gezeigten Struktur nicht aufgelöst ist.

K_v -Kanäle haben wie die meisten Ionenkanäle drei elementare Funktionen, die sich in ihren Proteindomänen und deren Bewegungen widerspiegeln: 1) das Aktivierungstor, das mit dem Eingangssignal (d.h. der Änderung der Membranspannung) wechselwirkt und den Kanal öffnet; 2) der Selektivitätsfilter, der die Permeabilität für Ionen bestimmt; 3) das „Inaktivierungstor“, dass für die Inaktivierung des Kanals verantwortlich ist. Die Kanalaktivierung wird bei einem Membranpotential von ca. -40 mV durch die Spannungsdetektionsdomäne ausgelöst. Die S4-Spannungsdetektionsdomäne enthält mehrere positiv geladene Aminosäurereste, typischerweise Arginine, die für ihre Bewegung durch die Membran bei einer Depolarisation verantwortlich sind. Diese Bewegung ist mechanisch mit der Verdrehung eines Helixbündels (S6) in der Porendomäne verbunden, die zur Öffnung des Kanaltors führt, durch das anschließend die Ionen fließen können.^[7, 44, 45] So kommt es zu einem Ionenstrom entlang des elektrochemischen Gradienten, der durch den Selektivitätsfilter kaliumspezifisch wird. Dieser Selektivitätsfilter besteht aus einem Stapel von quadratisch angeordneten Peptidcarbonylgruppen, die die Hydrathülle der sich durch den Filter bewegenden Kaliumionen ersetzen. Diese Kompenstation ist offenbar energetisch günstiger für Kalium als für Natriumionen.^[7]

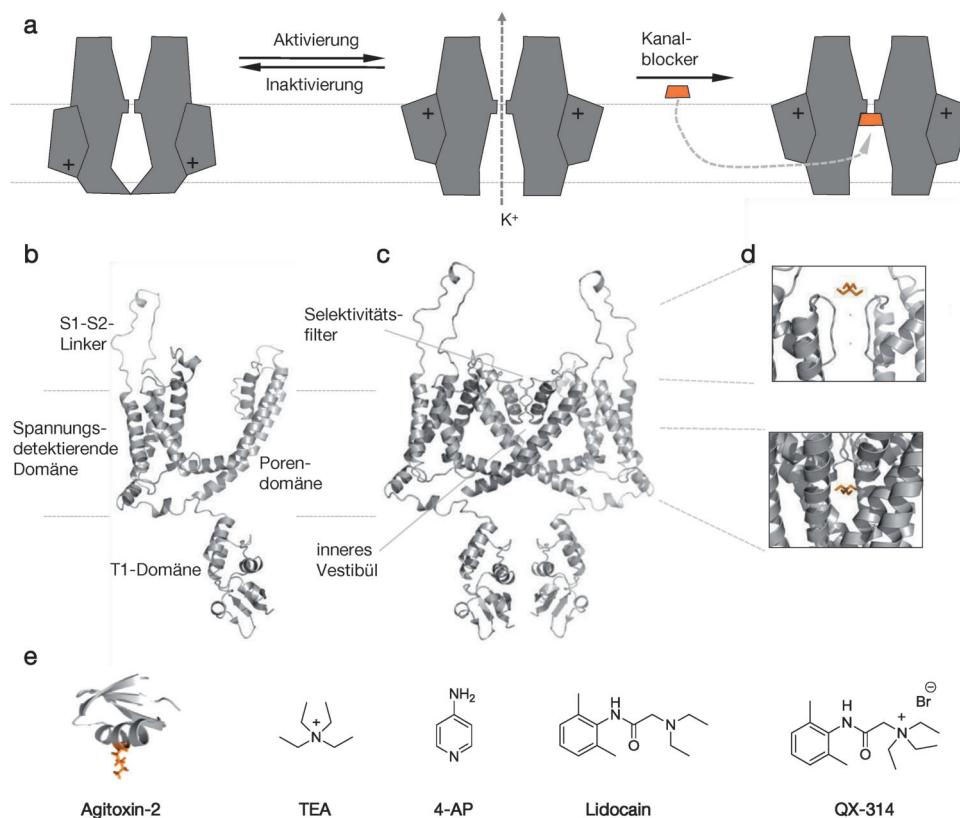


Abbildung 7. Struktur und Funktion von spannungsaktivierte Kaliumkanäle. a) Funktionszyklus und Kanalblockierung sind anhand einer schematischen Darstellung eines K_v -Kanals gezeigt. b) Eine einzelne $K_v1.2$ -Untereinheit zeigt das extrazelluläre S1-S2-Verbindungsstück, die spannungsdetektierende Domäne, die Membranporendomäne und die intrazelluläre T1-Domäne (pdb-Code: 3LUT). Die β -Untereinheit wurde entfernt, und das Inaktivierungspartikel ist nicht in der Struktur aufgelöst. c) Zwei von vier Untereinheiten zeigen die Architektur des Selektivitätsfilters und des inneren Hohlraumes an. d) Vergrößerte Sicht der TEA-Bindungsseite des inneren Hohlraums und äußeren Vestibüls (pdb-Codes: 2BOB und 2BOC). e) Chemische Strukturen von extrazellulären und intrazellulären Kaliumkanalblockern.

bracht.^[49a,50] Physiologisch gesehen führen die schnelle Inaktivierung der Na_v -Kanäle und die Ströme durch K_v -Kanäle zu einer Repolarisation der Nervenzelle und bestimmen damit die Dauer und Frequenz der Aktionspotentiale.^[51]

K_v -Kanäle können durch Cs^+ -Ionen, kleine organische Kationen und Peptidgifte blockiert werden. Peptidgifte wie Agitoxin-2 werden durch einige der gefährlichsten Tiere produziert. Zu diesen gehören der gelbe Mittelmeerskorpion, bestimmte Seeanemonen und die Grüne Mamba.^[45,52] Diese Peptide binden an das äußere Vestibül des Kanals und verstopfen seine Pore von der extrazellulären Seite mit einer protonierten Lysinseitenkette. Typische organische K_v -Kanalblocker sind quartäre Ammoniumionen wie Tetraethylammonium (TEA) und 4-Aminopyridin (4-AP; Abbildung 7).^[17c,53]

Interessanterweise haben K_v -Kanäle sowohl eine interne als auch eine externe Bindungsstelle für quartäre Ammoniumionen.^[54] Die externe TEA- K_v -Kanalblockierung ähnelt in ihrer Wirkung der protonierten Lysinseitenkette des Agitoxin-2. Intern wirkendes TEA ähnelt dem geladenem N-Typ-Inaktivierungsprofil. Um zur Wirkung zu gelangen, benötigt diese Art von Blockierung ein offenes Aktivierungstor. Deshalb werden intern agierende, geladene Blocker auch „offene Kanalblocker“ (open channel blocker) oder aktivitätsabhängige Blocker („use-dependent blockers“) genannt.^[17c] Genauere Einblicke in die interne und externe TEA-Bindung wurden durch KcsA-Kristallstrukturen mit cokristallisierten TEA-Analoga gewonnen.^[54]

6. Lichtempfindliche spannungsgesteuerte Kaliumkanäle

Spannungsaktivierte Kaliumkanäle sind wegen der Aufklärung ihrer Strukturen und des guten Verständnisses ihrer Funktionsweise hervorragende Kandidaten für optochemische Genetik. Das erste erfolgreich realisierte System war SPARK (der „synthetic photoisomerizable azobenzene-regulated K^+ channel“), ein Vertreter der PTL-Strategie (Abbildung 8).^[55] Wegen seiner hyperpolarisierenden Eigenschaften wurde er später in H-SPARK umbenannt. H-SPARK besteht aus dem Kanalblocker MAQ (Maleimid/Azobenzol/quartäres Ammoniumion), der kova-

lent mit einem genetisch eingeführten Cystein an einer extrazellulären Proteinschleife eines Kanals vom K_v1 -Typ verknüpft ist. Die geeignete Position (E422C) für die Cystein-substitution konnte durch Kristallstrukturen und mithilfe bereits bekannter molekularer Abstandsmessungen ermittelt werden.^[56] Sobald MAQ an das Cystein angeknüpft ist, wirkt dieses als ein „angeleintes“ TEA, dessen Leine durch Licht verlängert oder verkürzt werden kann. MAQ blockiert den Kanal in seinem ausgedehnten *trans*-Zustand, den es unter 500-nm-Lichteinwirkung oder in der Dunkelheit einnimmt. Bei Einstrahlung von 380-nm-Licht wird MAQ in seinen verkürzten *cis*-Zustand überführt und die Kanalblockierung wieder aufgehoben. Um H-SPARK zu einem effektiven Modulator des Membranpotentials zu machen, wurde die schnelle Inaktivierung des Kanals durch einen molekulargenetischen Eingriff entfernt. Durch eine weitere Punktmutation (L366A) wurde die Aktivierungsspannung von H-SPARK von -35 auf -70 mV verschoben, was vor der kovalenten Bindung von *trans*-MAQ zu einem konstant geöffneten Kanal führt. Nach der Verknüpfung mit MAQ ist der Kaliumkanal in Dunkelheit oder unter 500-nm-Lichteinwirkung blockiert. Bestrahlung mit 380-nm-Licht öffnet die Pore, und der folgende Auswärtsstrom führt zur Re- oder Hyperpolarisation der Membran. SPARK funktionierte nicht nur in

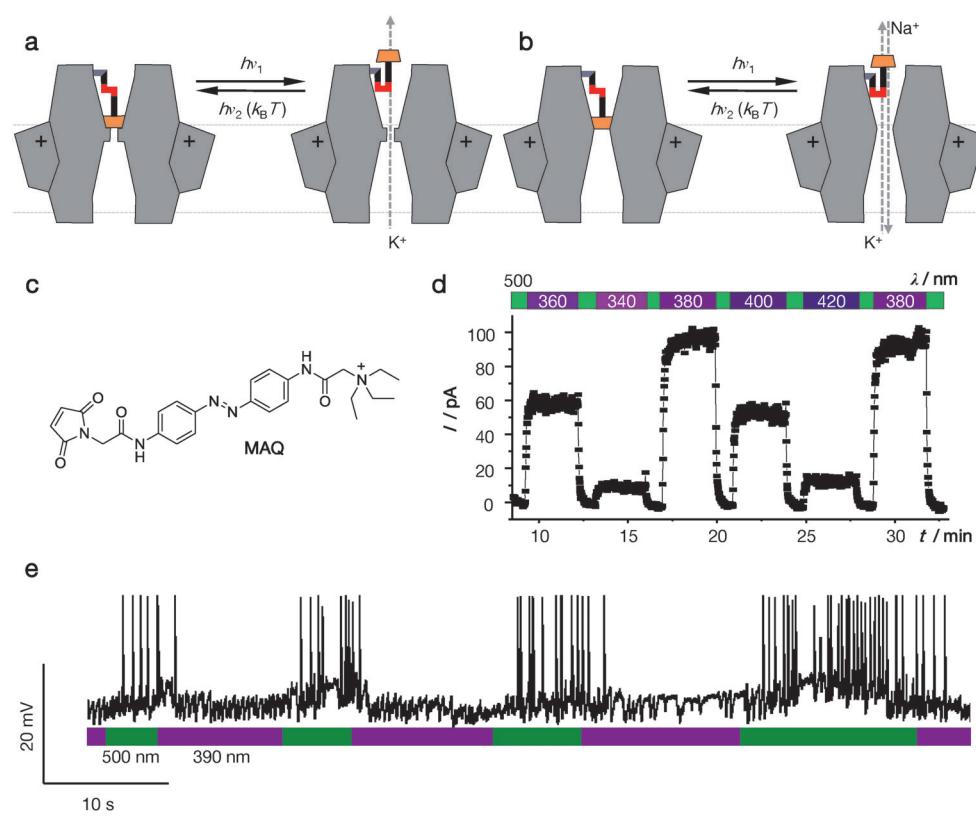


Abbildung 8. SPARK, ein lichtempfindlicher Kaliumkanal. a) Eine schematische Darstellung von H-SPARK, dem hyperpolarisierenden Kanal. b) Eine schematische Darstellung von D-SPARK, dem depolarisierendem Kanal. c) Die chemische Struktur von MAQ, dem PTL des SPARK-Systems. d) Reversible Lichtkontrolle des Kaliumstroms durch H-SPARK. Bestrahlung im UV-Bereich öffnet die Kanäle, wogegen 500-nm-Licht eine Blockierung induziert. Auswärtsströme werden konventionell nach oben gezeichnet. e) Lichtgesteuerte Kontrolle neuraler Aktivität durch H-SPARK, exprimiert in hippocampalen Neuronen. Originalgraphen der ersten experimentellen Messungen.

Xenopusoocyten, sondern auch in erregbaren Zellen, z. B. in dissozierten Neuronen.^[55] Angemerkt sei, dass SPARK 2004 das erste System war, mit dem Neuronen auf lichtabhängige Weise ruhiggestellt werden konnten.

Komplementär zum inhibierenden H-SPARK wurde eine depolarisierende SPARK-Version (D-SPARK) entwickelt.^[57] Eine einzelne Mutation (V443Q) reicht aus, um den kaliumselektiven H-SPARK-Kanal in einen unselektiven Kationenkanal zu überführen. Mit dieser Mutation im Selektivitätsfilter ändert sich das Permeabilitätverhältnis von K^+/Na^+ -Ionen zu 0.7, wodurch der Na^+ -Einstrom in die Zelle das Membranpotential dominiert. Nach dem kovalenten Verknüpfen von MAQ mit dem Kanal depolarisiert dieser die Zellmembran unter UV-Licht, anstatt sie zu hyperpolarisieren, was die neurale Aktivität der Zellen dämpft. Dies ist ein schönes Beispiel für die einfache funktionelle Umpolung („sign inversion“), die so typisch für die Neurobiologie ist.

Die Diversität von Kaliumkanälen, der Mangel an selektiver Pharmakologie und der Erfolg von H/D-SPARK lieferen die Motivation, die PTL-Strategie auf andere Mitglieder der K_v -Familie zu erweitern.^[58] $K_{v1.3}$ war der nächste Kaliumkanal, der durch die kovalente Verknüpfung mit MAQ lichtsteuerbar gemacht werden konnte. Physiologisch ist $K_{v1.3}$ für die Repolarisation von Neuronen von Bedeutung, und seine Blockierung ruft immunsuppressive Effekte hervor. Seine geringe TEA-Affinität wurde durch eine Punktmutation (H401Y) erhöht. Sowohl $K_{v3.1}$ als auch $K_{v7.1}$ konnten in analoger Weise in Photorezeptoren überführt werden. Die schnelle Inaktivierung von $K_{v3.1}$ hat einen entscheidenden Einfluss auf die hochfrequente neurale Aktivität im auditiven Hirnstamm und im Kleinhirn. Schließlich wurde das PTL-Konzept auf den schwach leitfähigen, intrazellulären, ligandenempfindlichen und Ca^{2+} -aktivierten SK2-Kanal angewendet.^[58] Zusammengenommen sind diese lichtgesteuerten Kanäle eine erste Demonstration für den in Abbildung 5 diskutierten PTL-Ansatz zur selektiven Pharmakologie.

Alternativ zu den PTLs kann man auch PCLs verwenden, um *native* K_v -Kanäle und damit neurale Aktivität mit Licht zu kontrollieren. Dazu wurde die cysteinreaktive Maleimidgruppe von MAQ durch diverse Reste ersetzt, was zu einer Serie von photochromen Blockern (XAQs) mit unterschiedlicher Pharmakologie und photophysikalischen Eigenschaften führte.^[59] Zu diesen Verbindungen zählen das Benzoat BzAQ sowie die Propyl- und Acrylamidvariante PrAQ bzw. AAQ (Abbildung 9). Detaillierte Studien zeigten, dass die XAQs als aktivitätsabhängige (use dependent) photochrome Blocker fungieren.^[59a] Dies trifft auch auf AAQ zu, das nicht, wie zunächst vermutet, kovalent mit der extrazellulären Seite des nativen Kanals reagiert. Um ihre pharmakologische Wirkung im inneren Hohlraum der Kanäle zu entfalten, müssen die XAQs zunächst die Membran durchqueren oder durch die Patchpipette in das Zytosol geladen werden. Nach externer Zugabe blockieren AAQ und BzAQ K_v -Kanäle in ihrem *trans*-Zustand, den sie in der Dunkelheit oder unter 500-nm-Bestrahlung einnehmen. Bei Bestrahlung mit 380-nm-Licht wird diese Blockierung wieder aufgehoben. Interessanterweise blockiert PrAQ bevorzugt im *cis*-Zustand (d.h. unter 380-nm-Bestrahlung), was ein weiterer Fall von funktioneller Umpolung ist.^[59a]

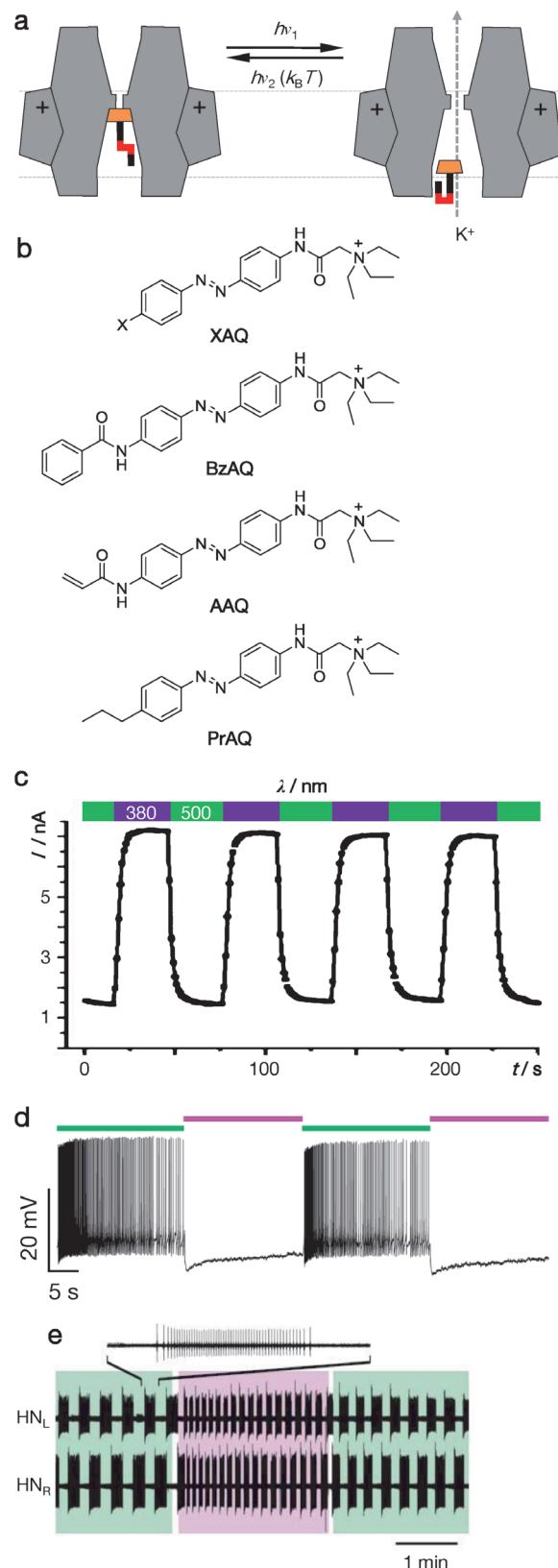


Abbildung 9. PCLs für spannungsaktivierte Ionenkanäle. a) Schematische Darstellung eines XAQ, der als geöffneter Kanalblocker an K_v -Kanälen agiert. b) Die chemischen Strukturen von BzAQ, AAQ und PrAQ, drei XAQs, die als PCLs an Kaliumkanälen wirken. c) AAQ blockiert reversibel Kaliumströme eines K_{v1} -Subtyps. d) Kontrolle von neuraler Aktivität von hippocampalen Neuronen durch AAQ. e) Herzschlagkontrolle eines Blutegels durch AAQ.

In ihrer Struktur und Funktion ähneln die XAQs dem klassischen Lokalanästhetikum Lidocain und seinem permanent geladenen Verwandten QX-314. Die Affinität der XAQ-Kopfgruppe lässt sich jedoch, anders als bei klassischen Wirkstoffen, zusätzlich mit Licht steuern. Wie Lidocain können XAQs einfach an Nervengewebe appliziert werden, was sie für therapeutische Ansätze interessant macht. Nach einer kurzen Warteperiode kann man mit ihnen zuverlässig die Nervenaktivität steuern (Abbildung 9). In Kleinhirnschnitten kontrolliert AAQ die Aktivität von Purkinje-Neuronen, hauptsächlich durch seinen inhibitorischen Effekt auf spezielle Interneuronen, die so genannten Basket-Neuronen.^[59b] AAQ wirkt auch auf das Herzschlagsmuster des Blutegels *Hirudo medicinalis*.^[59b] In diesen Tieren kontrollieren so genannte HN-Interneurone die Frequenz der Herzkontraktionen. Es konnte gezeigt werden, dass gewisse K⁺-Kanäle beim „burst firing“ dieser HN-Neurone eine große Rolle spielen. Dementsprechend konnte durch AAQ-Anwendung die Aktivität von HN-Neuronen mit Licht moduliert werden, wobei sich unter 380-nm-Belichtung die Phasen hochfrequenter neuraler Aktivität verkürzten und unter 500-nm-Licht verlängerten.

Ein Hauptziel unseres Programms besteht darin, die Absorptions- und Aktionsspektren der PTLs und PCLs in den roten Wellenlängenbereich zu verschieben, was eine bessere Gewebsdurchdringung ermöglichen würde und die Phototoxizität minimieren sollte. Dies kann durch relativ einfache Abwandlungen der Azobenzolchromophore erzielt werden. Zum Beispiel lieferte die Einführung von elektronenschiebenden Substituenten XAQs, die durch blaues Licht in ihren *cis*-Zustand überführt werden können. Als zusätzlicher Vorteil relaxieren diese Verbindungen im Dunkeln in den *trans*-Zustand innerhalb von Millisekunden und schalten sich damit von selbst ab (Abbildung 10). Deshalb muss man nicht mehr zwischen zwei verschiedenen Einstrahlungswellenlängen wechseln. Ein Beispiel dieser Verbindungsklasse ist DENAQ, dessen Aktionsspektrumsmaximum bei 480 nm liegt. Interessanterweise agiert die analoge Verbindung PhENAQ nicht als *trans*-Blocker, sondern als *cis*-Blocker (wiederum „Umpolung“). Blaues Licht führt hier zum blockierenden Zustand, der in Dunkelheit automatisch in den inaktiven Zustand zurückkehrt. Dementsprechend kann neurale Aktivität durch Einstrahlen von blauen Licht ausgelöst und in Dunkelheit wieder unterbunden werden.^[42]

7. Ionotrope Glutamatrezeptoren

Ionotrope Glutamatrezeptoren (iGluRs) spielen eine zentrale Rolle bei der synaptischen Signalübertragung.^[17a, 60] Diese primär in der postsynaptischen Membran lokalisierten, ligandengesteuerten Ionenkanäle werden durch den Neurotransmitter Glutamat aktiviert, der aus Vesikeln an der präsynaptischen Membran freigesetzt wird. Die Bindung von Glutamat an iGluRs erzeugt einen depolarisierenden Strom, der zum exzitatorischen postsynaptischen Potential (EPSP) führt. Durch den wesentlichen Beitrag der iGluRs zur neuronalen Kommunikation ist es nicht überraschend, dass sie mit einer Vielzahl von neurologischen Krankheiten, wie Alzheimer-

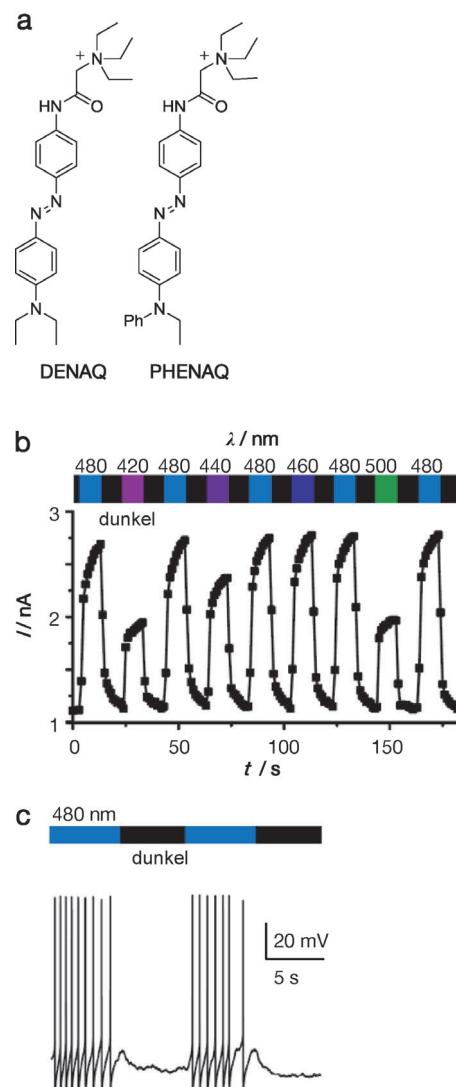


Abbildung 10. Rotverschobene photochrome XAQs. a) Die chemische Struktur von DENAQ und PhENAQ, zwei rot verschobenen XAQs. b) Aktionsspektrum von DENAQ. c) Kontrolle neuraler Aktivität mit PhENAQ.

mer, Epilepsie und den Folgeschäden eines Gehirnschlags in Zusammenhang gebracht und zu wichtigen neuropharmakologischen Zielen wurden.^[61]

iGluRs lagern sich in höheren Tieren als Tetramere zusammen. Ihre Leitfähigkeit zeigt bezüglich einwertiger Ionen geringe Selektivität, und in Einzelfällen sind sie auch calciumpermeabel. Aufgrund von funktionellen Unterschieden und ihrer Empfindlichkeit gegenüber gewissen synthetischen Liganden lassen sie sich in *N*-Methyl-D-aspartat(NMDA)-Rezeptoren und Nicht-NMDA-Rezeptoren einteilen. Letztere werden weiter in AMPA, Kainat und δ-Rezeptoren unterteilt.^[51, 62]

AMPA-Rezeptoren, die nach einem selektiven Agonisten benannt wurden, bilden homo- und heteromere Kanäle aus, die aus GluA1-GluA4-Untereinheiten bestehen.^[51, 62] Sie vermitteln die anfängliche Depolarisation postsynaptischer Zellen nach präsynaptischer Glutamatfreisetzung, und ihre

Aktivierungs- und Inaktivierungskinetiken liegen im Millisekundenbereich. Dies macht AMPA-Rezeptoren zu den Akteuren bei der schnellen exzitatorischen synaptischen Reizübertragung.^[51,62]

Kainatrezeptoren haben im Unterschied zu AMPA-Rezeptoren einen eher modulatorischen Einfluss auf die neurale Aktivität.^[62,63] Ihre genaue Funktionweise ist nicht so gut verstanden wie die der AMPA-Rezeptoren. Homo- und heteromere Kainatrezeptoren lagern sich aus GluK1-GluK5-Untereinheiten zusammen. Eine weitere Unterkategorie von Nicht-Glutamatrezeptoren, die δ -Rezeptoren, bestehen aus GluD1- oder GluD2-Untereinheiten. Die Funktion dieser Rezeptoren ist jedoch ebenfalls unbekannt.^[62]

NMDA-Rezeptoren bilden immer Heterotetramere aus sieben möglichen Untereinheiten. Die Aktivierung der Kanäle erfolgt durch gleichzeitige Koordination von Glutamat und Glycin (oder D-Serin) und benötigt zusätzlich ein erhöhtes Membranpotential von mindestens -30 mV . Dies macht NMDA-Rezeptoren zu Detektoren der gleichzeitigen präsynaptischen Neurotransmitterausschüttung und Depolarisation der postsynaptischen Zelle (coincidence detector).^[51,62] Darüber hinaus leiten NMDA-Rezeptoren nicht nur Na^+ - und K^+ -, sondern auch Ca^{2+} -Ionen. Diese sind für die Aktivierung von intrazellulären Proteinen, z.B. der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (CamKII), verantwortlich. Daher spielen NMDA-Rezeptoren eine wichtige Rolle im Prozess der Synapsenverstärkung, die mit Lern- und Gedächtnissprozessen in Zusammenhang gebracht wird^[51,64].

Die einzelnen iGluR-Untereinheiten umfassen jeweils eine extrazelluläre aminoterminale Domäne (NTD), eine Ligandenbindungsdomäne (LBD), eine Transmembrandomäne (TMD) und eine intrazelluläre carboxyterminale Domäne (CTD). Die NTD spielt eine Rolle bei der subtypspezifischen Zusammenlagerung und Modulation des Rezeptors, während die LBD eine Bindungsstelle für Agonisten (oder Antagonisten) enthält. Zwei mit D1 und D2 bezeichneten Unterdomänen der LBD bilden eine muschelähnliche Struktur. Die TMD besteht aus drei Transmembranhelices (M1, M3 und M4) und einer Porenhelix (M2). Die CTD spielt eine Rolle bei der räumlichen Positionierung, der Stabilisierung und dem Abbau des Kanals.^[51,62]

Die ersten kristallographischen Studien an iGluRs wurden mit löslichen LBD-Muschelschalendomänen durchgeführt, die aus dem Gesamtkanal durch kluges Protein-Engineering herausgelöst wurden.^[63] Um ein klares Verständnis für die Wechselwirkung zwischen Ligand und Ligandenbindungsdomäne zu bekommen, wurden diverse Agonisten, Antagonisten und Verbindungen, die die Desensibilisierung beeinflussen, cokristallisiert.^[63] Diese Studien zeigten unter anderem, dass die Bindungsseite von Glutamat in allen Glutamatrezeptoren konserviert ist und der Grad des Zuklappens der LBD mit der Aktivität des Liganden als eines partiellen oder vollen Agonisten korreliert.^[62,65] In Übereinstimmung damit binden Antagonisten, z.B. DNQX, derart, dass es zu keinem vollständigen Zuklappen der Ligandenbindungsdomäne kommt und dementsprechend der biologische Effekt ausbleibt.^[61] Dieser „Fuß in der Tür“-Mechanismus für Antagonismus erklärt, warum eine kleine chemische

Änderung der Agonistenstruktur einen Antagonisten hervorbringen kann.

Ein entscheidender biophysikalischer Durchbruch gelang 2009, als die Kristallstruktur des homomeren GluA2-Rezeptors mit einer Auflösung von 3.6 \AA gelöst wurde (Abbildung 11b).^[12] Dieser AMPA-Rezeptor wurde mit einem hochaffinen Antagonisten cokristallisiert, was den Kanal in seinen geschlossenen, nicht leitenden Zustand überführte. Die Struktur bestätigte, dass sich der Rezeptor als Dimer von zwei Dimeren, mit einer auf den gesamten Rezeptor bezogenen C_2 -Symmetrie, bildet. Die Architektur der TMD erinnert an einen „umgedrehten“ Kaliumkanal, der statt mit einem Spannungssensor mit einem Ligandensor (der LBD) verbunden ist.

Der Aktivitätszyklus der Glutamatrezeptoren kann in drei Phasen unterteilt werden: einen inaktiven, ruhenden Zustand; einen aktivierte, nicht desensibilisierten Zustand; und einen inaktiven, desensibilisierten Zustand. Die LBDs der vier Untereinheiten sind so arrangiert, dass sich jeweils zwei LBDs entlang der C_2 -Achse mit dem „Rücken“ zueinander befinden. Koordination von Glutamat an die LBD des inaktiv ruhenden Rezeptors führt zum Schließen der LBD. Die Bewegung der unteren Hälfte der LBD (D2) übt eine Zugkraft auf das Verbindungsstück zwischen der LBD und der TMD aus, was den Kanal mechanisch öffnet. Allerdings erzeugt dieser aktivierte, nicht desensibilisierte Zustand mechanische Spannung an der Grenzfläche zwischen den LBDs. Diese mechanische Spannung kann durch die Dissoziation der Agonisten oder durch eine Verdrehung der LBD-Grenzflächen, die zum inaktivierten Zustand führt, abgebaut werden.^[62]

8. Lichtempfindliche ionotrope Glutamatrezeptoren

Genauso wie das äußere Vestibül der Kaliumkanäle einen passenden Ansatzpunkt für MAQ lieferte, ermöglichte die strukturell gut charakterisierte Ligandenbindungsdomäne der Glutamatrezeptoren den Einsatz von photoschaltbaren angeleinten Liganden (d.h. PTLs). Anstelle von Kanalblockern oder Antagonisten entschieden wir uns in diesem Fall aber für Agonisten. Diese Wahl lieferte den lichtgesteuerten ionotropen Glutamatrezeptor, LiGluR, der sich aus einem genetisch modifizierten Kainatrezeptor (GluK2) und dem PTL MAG-1 zusammensetzt (Abbildung 12).^[66] MAG-1 besteht aus einem Maleimid für die kovalente Verknüpfung, einem Azobenzol und einem substituierten Glutamat als Liganden. Nach der kovalenten Verknüpfung von MAG-1 mit einem Cystein der LBD (L439C) resultiert die lichtinduzierte *cis/trans*-Isomerisierung des Azobenzols in reversibler Bindung des angeleinten Agonisten, wodurch sich der Kanal öffnet oder schließt.

Das Design von LiGluR basiert auf der Kristallstruktur der geschlossenen GluK2-LBD, an die der Agonist (*2S,4R*)-4-Methylglutamat gebunden ist (pdb-Code: 1SD3).^[63] Diese Struktur sprach für das Vorhandensein eines kleinen „Fluchttunnels“, der vom gebundenen Liganden bis zur Oberfläche der geschlossenen LBD reicht. Dieser Tunnel sollte es ermöglichen, dass ein Ligand kovalent an die externe

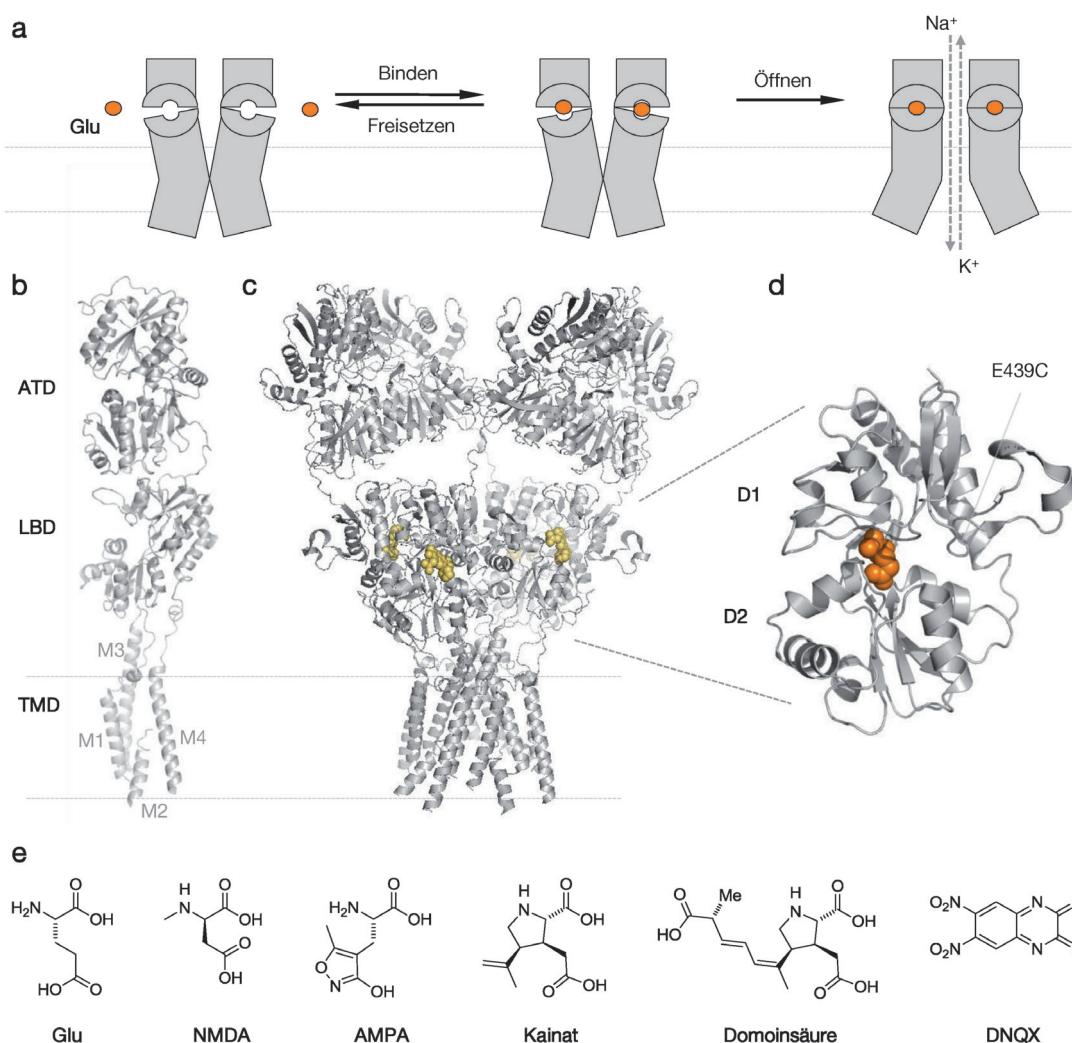


Abbildung 11. Ionotrope Glutamatrezeptoren. a) Schematische Darstellung des Öffnungsvorganges eines Glutamatrezeptors. b) Kristallstruktur einer einzelnen GluA2-Untereinheit mit markierter TMD (inklusive M1-4), extrazelluläre LBD und NTD. c) Der komplette GluA2-Kanal cokristallisiert mit einem Antagonisten (gelb; pdb-Code: 3KG2). d) Vergrößerte Ansicht der LBD von GluA2, cokristallisiert mit Glutamat (pdb-Code: 1FTJ). e) Chemische Strukturen verschiedener iGluR-Agonisten und -Antagonisten.

LBD gebunden ist und trotzdem als Agonist oder partieller Agonist den Rezeptor aktiviert. Um diese Hypothese zu untermauern, wurde ein „Testmodell“ (T-Mod) synthetisiert. Durch Calciumbildung an HEK293-Zellen konnte gezeigt werden, dass das T-Mod und später MAG-1 tatsächlich als Agonisten wirken.^[66] Weitere Kristallstrukturen, wie jene des partiellen Agonisten Domoinsäure, gebunden an GluK2 (pdb-Code: 1YAE), halfen zusätzlich passende PTLs zu finden.^[67]

Nach dem Erfolg des Testmodells wurde das Molekül durch die Installation eines Azobenzols und Addition eines Maleimid zu MAG-1 erweitert. Um die passende Verknüpfungsposition für das Maleimid zu finden, wurden mehrere Cysteinmutanten von GluK2 durch Mutagenese generiert. Nach Testen von einem guten Dutzend Mutanten zeigte sich, dass die Mutante L439C die günstigste Position für die kovalente Verknüpfung mit MAG-1 zur lichtempfindlichen Kontrolle der Kanalaktivität war.^[66]

Da von vornherein nicht klar war, ob und bis zu welchem Ausmaß das Protein die Photophysik des Azobenzols beeinflussen würde, wurden die optimalen Aktivierungs- und Inaktivierungswellenlängen experimentell bestimmt (Abbildung 12).^[66] Es zeigte sich, dass Einstrahlung von 380-nm-Licht in einem maximalen Strom resultierte, wogegen 500-nm-Licht am schnellsten zur Inaktivierung des Kanals führte. Interessanterweise stimmen diese Befunde gut mit den photostationären Zuständen von MAG-1 in freier Lösung überein (Abbildung 12). Eine weitere interessante Eigenschaft des LiGluR-Systems ist die gegenüber derjenigen der freien Lösung verlangsamte thermische Relaxation von *cis*-MAG-1.^[41] Ein möglicher Grund könnte die nichtkovalente Wechselwirkung des Glutamylganden mit der LBD sein, die den *cis*-Zustand stabilisiert.

Nach Expression in Neuronen, die die gesamte Maschinerie zur Generation von Aktionspotentialen enthalten, kann man mit LiGluR neurale Aktivität mit einer Auflösung im Millisekundenbereich kontrollieren.^[68] Bei einer gegebenen

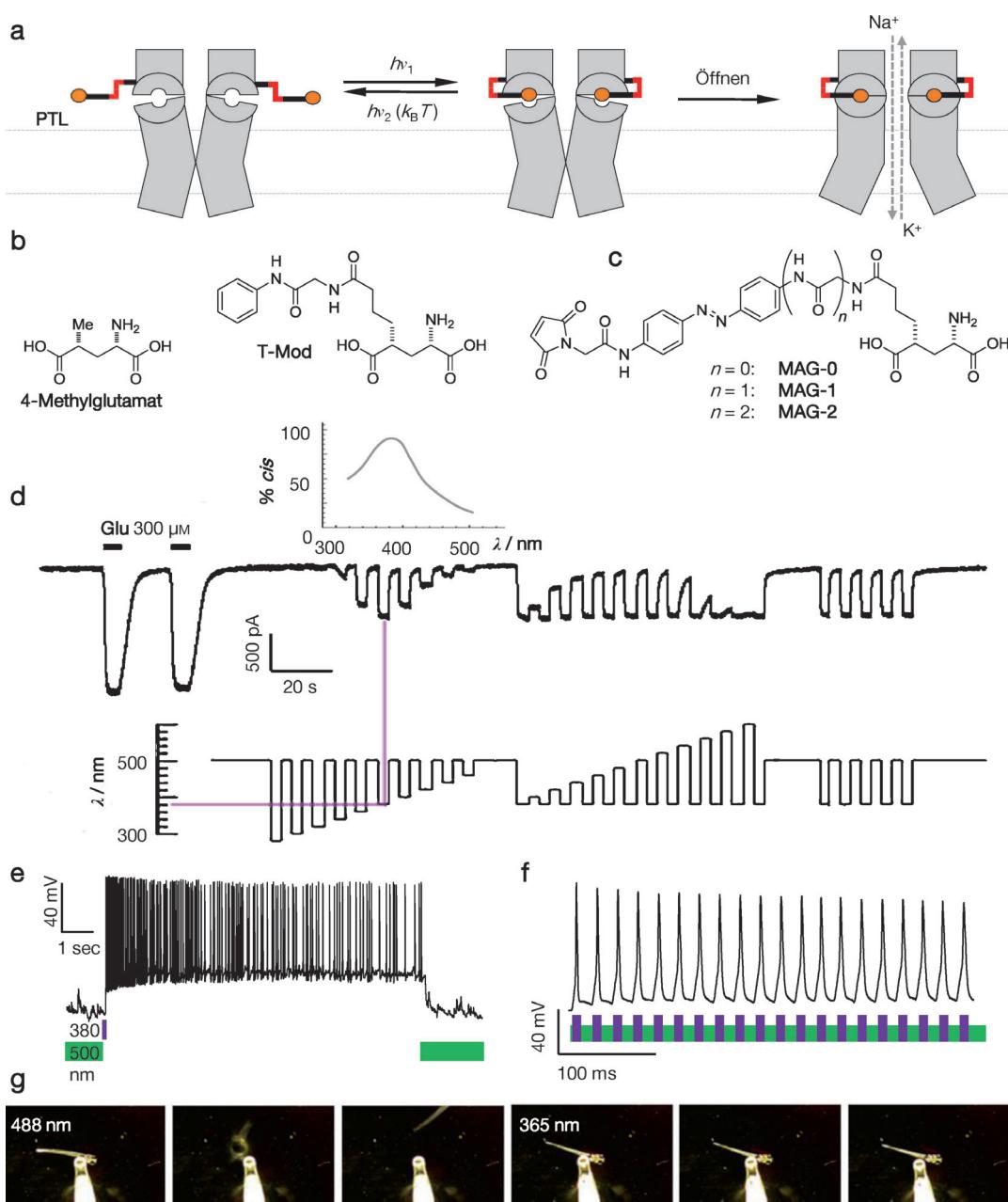


Abbildung 12. LiGluR, ein lichtschaltbarer Glutamatrezeptor. a) Schematische Darstellung von LiGluR. b) Chemische Struktur von 4-Methylglutamat und dem „Testmodell“ (T-Mod), zwei wichtigen Meilensteinen auf dem Weg zu LiGluR. c) Chemische Struktur von MAG-0, MAG-1 und MAG-2. d) Das Aktionsspektrum von LiGluR. Konventionell sind Einwärtsströme nach unten gezeichnet. Die Stromstärke weist eine deutliche Abhängigkeit von der Wellenlänge auf. e) LiGluR kontrolliert neurale Aktivität mit Millisekundenpräzision. Bedingt durch die *cis*-Stabilität des Systems reicht eine kurze UV-Bestrahlung aus, um dauerhaft neurale Aktivität auszulösen. f) LiGluR ermöglicht es, einzelne Aktionspotentiale mit einer Frequenz von bis zu 50 Hz auszulösen. g) Lichtkontrollierter Fluchtflex von Zebrafischen.

Intensität ermöglicht es das System, mit kurzen sich abwechselnden Lichtpulsen (1–5 ms) von 380 und 500 nm reproduzierbare Aktionspotentialmuster zu generieren. In dissozierten hippocampalen Neuronen können Aktionspotentiale mit einer Frequenz bis zu 50 Hz ausgelöst werden, ohne einen einzigen Takt auszulassen (Abbildung 12).^[68] Die *cis*-Stabilität von MAG ermöglicht es außerdem, mit einem einzelnen, wenige Millisekunden langen 380-nm-Lichtpuls mehrere Sekunden lang neurale Aktivität zu induzieren. To-

xische Effekte durch lange Bestrahlungsdauern können so vermieden werden.^[68,69]

LiGluR weist einige fundamentale funktionelle Unterschiede zu SPARK auf. So sind für die Öffnung des SPARK-Kanals sowohl die Bestrahlung als auch die Depolarisation der Zelle nötig (was einem AND-Logikgatter entspricht). Im Unterschied hierzu reicht freies Glutamat oder Lichteinwirkung für die Aktivierung von LiGluR aus (einem OR-Logikgatter entsprechend). LiGluR kann als eine lichtbetrie-

bene molekulare Maschine interpretiert werden, bei der die Energie der Photoisomerisierungsenergie in die bei der Ligandenbindung freiwerdende Energie umgewandelt wird. Dies führt zum Schließen der LBD und Öffnung des Kanals. Der Vorgang kann durch thermische Relaxation oder Einstrahlung längerwelligen Lichts rückgängig gemacht werden. SPARK ist dagegen eher ein passives System, da der angeleinte lichtschaltbare Blocker eher als extrazellulärer Torwächter fungiert und selbst keine größeren Konformationsänderungen des Kanals auslöst. Diese werden stattdessen durch die Membranpolarisation bewirkt, die eine Bewegung der Spannungsdetektoren auslöst und das Spannungstor öffnet.

Eine wichtige allgemeine Eigenschaft von unseren Systemen – und besonders von LiGluR – ist ihre große Variabilität und Fähigkeit zur Feinjustierung. Dies trifft sowohl auf den Photoschalter als auch auf das Protein zu. So wurden außer MAG-1 noch weitere Derivate, nämlich MAG-0 und MAG-2, mit unterschiedlicher Länge und Flexibilität synthetisiert. Auf Proteinebene wurden durch Mutagenese weitere Cysteinmutanten für die kovalente Verknüpfung zu den MAG-Derivaten geschaffen. Die Kombination dieser Varianten lieferte einige interessante Resultate. Zum Beispiel zeigte MAG-0 mit der Mutante L439C die höchste effektive Konzentration in Konkurrenz mit dem Antagonisten DNQX. Dagegen waren unser erster PTL MAG-1 und MAG-2 weniger effektiv.^[69]

In einem weiteren Fall von „Umpolung“ fanden wir, dass der Anknüpfungspunkt des PTLs bestimmen kann, ob er den Kanal im *cis*- oder *trans*-Zustand des Photoschalters aktiviert (Abbildung 13).^[69] MAG-0 wirkt in Kombination mit der Mutante L439C als ein *cis*-Agonist, in Kombination mit L486C dagegen als *trans*-Agonist. Dieser Befund war etwas überraschend, da der Abstand der beiden Cysteinmutations-

positionen in der GluK2-Kristallstruktur nur wenige Ångström beträgt. Als Konsequenz dieser umgedrehten Wellenlängenempfindlichkeit löst man in Neuronen, die mit L486C transzisiert wurden, bei Bestrahlung mit 500-nm-Licht neurale Aktivität aus, aber nicht wie zuvor bei 380 nm.

In Analogie zur Umwandlung von H-SPARK zu D-SPARK kann LiGluR in einen hyperpolarisierenden Kanal namens „HyLighter“ überführt werden.^[70] Dies gelang wie zuvor durch Veränderung der Ionenselektivität mithilfe genetischer Manipulationen. Anstelle einer einzelnen Punktmutation musste im Fall von HyLighter eine ganze Proteindomäne ausgetauscht werden. HyLighter besteht aus der lichtempfindlichen Domäne von LiGluR, bei dem die Transmembrandomänen (TMDs) durch die kaliumselektive TMD des prokaryotischen Glutamatrezeptors SGLuR0,^[71] die ein GYG-Motiv der Kaliumkanäle enthält, ausgetauscht wurde. Die Expression von HyLighter in hippocampalen Neuronen ermöglicht eine lichtabhängige Hemmung von neuraler Aktivität bei Bestrahlung mit 380-nm-Licht, die bei 500 nm wieder aufgehoben werden kann (Abbildung 13). Ein Vorteil des HyLighter-Systems gegenüber anderen, genetisch voll kodierbaren hyperpolarisierenden Systemen liegt in der thermischen Stabilität des an die LBD koordinierenden *cis*-MAG-1. In Analogie zu LiGluR reicht ein einzelner, wenige Millisekunden langer 380-nm-Lichtpuls aus, um die Aktivität von Neuronen für Sekunden bis hin zu Minuten zu hemmen.

Eine der großen Überraschungen bei der Entwicklung optochemischer Systeme war, wie schnell sie in Tieren eingesetzt werden konnten, um Verhalten zu steuern.^[68, 70] Die ersten In-vivo-Experimente mit LiGluR wurden in den Larven des Zebrafisches durchgeführt.^[68] Der Zebrafisch ist in diesem Entwicklungsstadium nahezu vollständig transparent, was es ermöglicht, neurale Schaltkreise mit Licht zu beeinflussen. Die LiGluR-Variante iGluK2-L439C wurde in bestimmten Neuronengruppen, die in der Berührungssensorik eine Rolle spielen und im Kopf und Rumpf lokalisiert sind, exprimiert. Die Verknüpfung mit dem PTL gelang durch einfache Inkubation der Fische in einer MAG-1-haltigen Lösung. Danach konnte ein Fluchtreflex, der durch Berührung des Rumpfes mit einer Pipette ausgelöst wird, mit LiGluR optisch kontrolliert werden. Durch kurze Bestrahlung mit 365-nm-Licht wurde der Fluchtreflex der Fische unterdrückt, während er bei 488-nm-Bestrahlung wieder hergestellt werden konnte.^[68] HyLighter konnte auf ähnliche Art eingesetzt werden.^[70]

In darauffolgenden, anspruchsvoller Studien am Zebrafisch wurde LiGluR gezielt in Kolmer-Agduhr-Neuronen exprimiert, deren physiologische Rolle mehr als 75 Jahren lang ungeklärt war. Dank LiGluR konnte gezeigt werden, dass diese Zellen im frühen Entwicklungsstadium von Vertebraten als zentrale Taktgeber (central pattern generators) fungieren.^[72]

Außer den PTLs ließen sich auch PCLs auf Glutamatrezeptoren anwenden (Abbildung 14). Ihr Design basierte auf der umfangreichen Pharmakologie von iGluR-Agonisten, -Antagonisten und -Blockern und wurde zusätzlich von Kristallstrukturen verschiedener iGluR LBDs gestützt. Das Ersetzen der Naphthyleinheit des bekannten GluK1- und GluK2-Agonisten LY339434 mit einem Azobenzol lieferte 4-

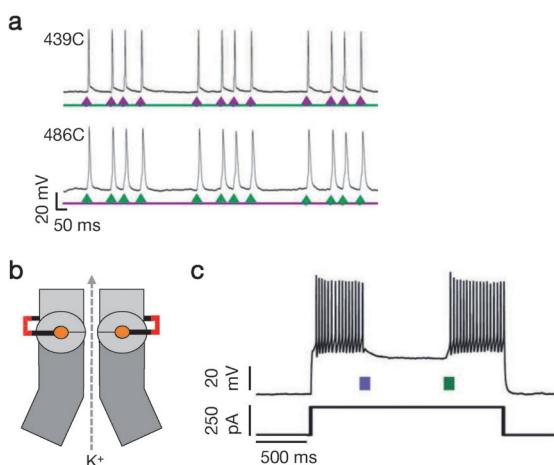


Abbildung 13. Umpolung durch Variation von LiGluR. a) MAG-0 in Kombination mit der Mutante 439C löst neurale Aktivität unter 380-nm-Licht aus, MAG-0 in Kombination mit der Mutante 486C dagegen neurale Aktivität unter 500-nm-Beleuchtung. b) Schematische Darstellung von HyLighter, einem hyperpolarisierenden lichtschaltbaren Glutamatrezeptor. c) HyLighter kann zur Hemmung neuraler Aktivität genutzt werden. Ausgelöste APs können unter 380-nm-Bestrahlung unterbunden und unter 500-nm-Bestrahlung wieder induziert werden, was die Bistabilität des Systems demonstriert.

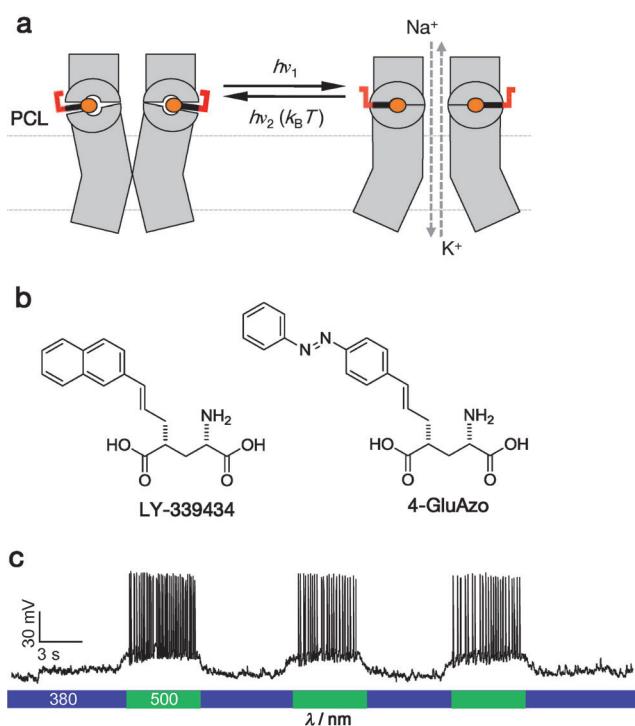


Abbildung 14. Anwendung der PCL-Strategie auf ionotrope Glutamatrezeptoren. a) Schematische Darstellung des Wirkmechanismus eines PCL an einem Glutamatrezeptor. b) Strukturen von LY-339434 und 4-GluAzo, einem Kainatrezep-PCL. c) Aktivitätskontrolle von hippocampalen Neuronen durch 4-GluAzo.

GluAzo. Diese Verbindung erwies sich als ein hocheffektiver photochromer Agonist für Kainatrezeporen.^[73] Bei Anwendung auf in HEK-Zellen exprimierte GluK1- und GluK2-Kanäle kann man Einwärtsströme reversibel mit Licht kontrollieren. 4-GluAzo zeigte eine leicht erhöhte Selektivität für GluK1 gegenüber GluK2, und beide Rezeptoren wurden bevorzugt von der *trans*-Form des Azobenzols aktiviert. In dissozierten hippocampalen Neuronen wirkte 4-GluAzo wie ein „reversibel photoaktivierbares Glutamat“.^[73] Das Feuern von Aktionspotentialen konnte durch wechselnde Bestrahlung von 380- und 500-nm-Licht induziert bzw. gehemmt werden.^[73] In folgenden Arbeiten konnte das phasenweise Feuern der Purkinje-Neuronen des Kleinhirns durch 4-GluAzo effektiv gesteuert werden.^[74]

Zahlreiche Fragen über den genauen Wirkungsmechanismus von 4-GluAzo und anderen PCLs bleiben offen. Insbesondere wäre es interessant zu verstehen, ob die PCLs während der Photoisomerisierung an die Bindungsseite koordiniert sind oder ob sie abdissoziieren müssen, bevor es zum Schalten kommen kann. Röntgenkristallstrukturen könnten auch wichtige Einblicke in den Bindungsmodus von PCLs und PTLs liefern und damit deren weitere Entwicklung erleichtern.

9. Pentamere ligandengesteuerte Ionenkanäle

Pentamere ligandengesteuerte Ionenkanäle (pLGICs) spielen eine wichtige Rolle bei der synaptischen Reizüber-

tragung.^[51] Im Unterschied zu den Glutamatrezeptoren von Säugetieren können pLGICs einen erregenden oder hemmenden Einfluss auf postsynaptische Neuronen und Muskelzellen nehmen. Zur Klasse der pLGICs gehören die nikotinischen Acetylcholinrezeptoren (nAChR), die γ -Aminobuttersäurererezeptoren (GABA_A und GABA_C), der 5-HT₃-Rezeptor (ein Serotoninrezeptor) und die Glycinrezeptoren (GlyRs).^[75] Sämtliche pLGIC-Untereinheiten weisen in einer konservierten extrazellulären Region eine Disulfidbrücke auf, die den pLGICs zusätzlich den Namen „Cys-Schleifen-Rezeptoren“ gegeben hat. GABA_A und GABA_C sind chloridselektive Ionenkanäle, die für die schnelle Inhibition von neuraler Aktivität im Gehirn und in der Retina verantwortlich sind.^[76] Der Serotoninrezeptor 5-HT₃ ist ein exzitatorischer Kationenkanal, der die Neurotransmitterfreisetzung beeinflusst. Wie die GABA_A-Rezeptoren haben die GlyRs einen inhibitorischen Effekt auf die neurale Kommunikation. Sie sind ligandengesteuerte Chloridkanäle, die hauptsächlich im Rückenmark und im Hirnstamm zu finden sind (Abbildung 15).^[77]

Die nikotinischen Acetylcholinrezeptoren sind exzitatorische Kationenkanäle, die im gesamten Nervensystem und an den motorischen Endplatten auftreten.^[78] Fünf unterschiedliche Untereinheiten des Muskel-Typ-nAChR – α_1 , β_1 , γ , ϵ und δ – bilden einen pentameren Kanal mit der Stöchiometrie (α_1)₂ $\beta_1\gamma\delta$.^[51,78b] Die neuronalen nAChRs bestehen aus den Untereinheiten α_2 – α_{10} und β_2 – β_4 . Sie bilden sowohl homomere (z.B. (α_7)₅) als auch heteromere Kanäle (z.B. (α_4)₂(β_2)₃). Interessanterweise bilden ausschließlich die α_7 -, α_8 - und α_9 -Formen homomere Rezeptoren, wenn sie heterolog exprimiert werden.^[78b,79]

Jede Untereinheit der nAChRs besteht aus einer extrazellulären, N-terminalen Ligandenbindungsstelle, einer Transmembranregion mit vier Transmembranhelices und einer intrazellulären Region (Abbildung 15). Sowohl der N- als auch der C-Terminus befinden sich im extrazellulären Raum. Die Transmembranhelices der fünf einzelnen Untereinheiten bilden die Pore des Ionenkanals. Der (α_1)₂ $\beta_1\gamma\delta$ -Rezeptor an den neuromuskulären Endplatten hat zwei Ligandenbindungsstellen, die sich zwischen den α - γ - und den α - δ -Untereinheiten befinden. Beide Koordinationsstellen haben eine unterschiedliche Affinität für den Neurotransmitter Acetylcholin (ACh), wobei für die Öffnung der Kanalpore beide Koordinationsstellen mit ACh besetzt sein müssen.^[51,78b]

Die Strukturbiologie von nAChR hat eine lange Geschichte, da dieser Kanal noch vor dem Aufkommen des molekularen Klonierens und der heterologen Expression im elektrischen Organ des Rochens *Torpedo californica* entdeckt wurde und folglich leicht zugänglich war.^[17c,51] Durch Elektronenmikroskopie konnte ein Strukturmodell des *Torpedo*-nAChR mit einer Auflösung von 4 Å konstruiert werden.^[15a,80] Vor wenigen Jahren wurden die Kristallstrukturen von zwei bakteriellen homologen – ELIC und GLIC – die in ihrem geschlossenen bzw. geöffneten Zustand kristallisiert, was ein detailliertes Bild der pentameren Anordnung ergab und zum Verständnis des Öffnungsvorgangs (gating) von pLGICs beitrug.^[15b,c] Leider wurden keine der oben genann-

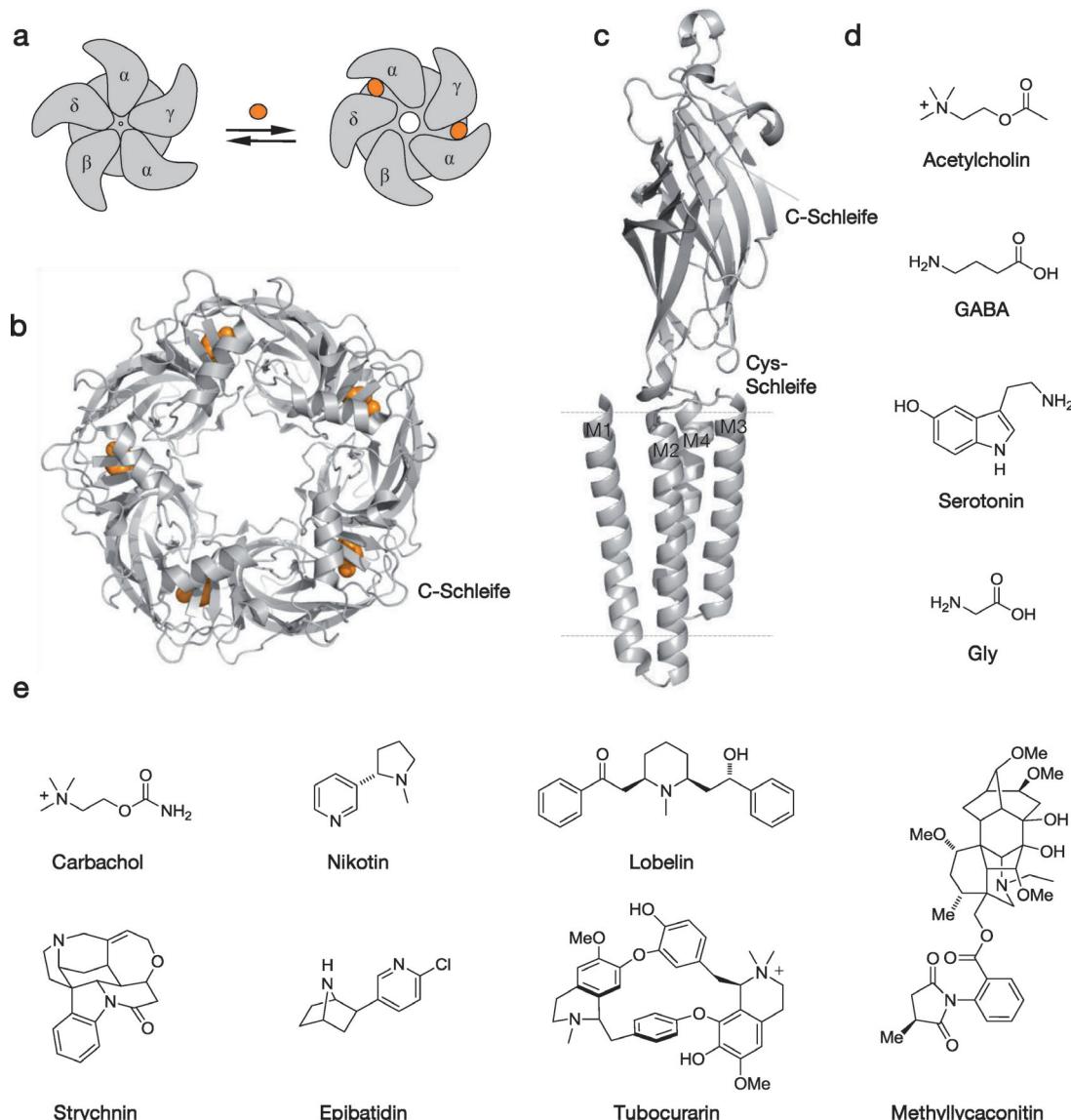


Abbildung 15. Pentamere ligandengesteuerte Ionenkanäle (pLGICs). a) Schematische Ansicht des nAChR-Öffnungsvorganges. b) Kristallstruktur des Acetylcholinbindungsproteins (AChBP), cokristallisiert mit Nikotin (pdb-Code: 1UW6). c) Eine einzelne Untereinheit eines pLGIC umfasst die Transmembrandomäne, die extrazelluläre Ligandbindungsdomäne und die Cys-Schleife (pdb-Code: 3P4W). d) Endogene Liganden, die pLGICs aktivieren. e) Weitere bekannte Liganden der pLGICs, die mit dem AChBP cokristallisiert wurden.

ten Rezeptoren zusammen mit Agonisten und Antagonisten kristallisiert.

Die Kristallstrukturen des Acetylcholinbindungsproteins der Seeschnecken *Limnia stagnalis* (L-AChBP) und *Aplysia californica* (A-AChBP) vertieften das Verständnis der Wechselwirkung von pLGICs mit ihren Liganden.^[81] Diese löslichen Proteine sind homolog mit der extrazellulären Ligandenbindungsdomäne der pLGICs, enthalten aber nicht die Transmembrandomäne. Ein Sequenzvergleich von L-AChBP mit verschiedenen pLGICs zeigte eine 20–24-prozentige Übereinstimmung mit den nAChR-Untereinheiten und eine 15–18-prozentige Übereinstimmung mit den 5-HT₃-, GABA_A--, GABA_C- und Glycin-Rezeptoruntereinheiten.^[81b] Die Kristallstruktur von L-AChBP, cokristallisiert mit Nikotin und Carbachol, zeigte, dass diese kationischen Liganden

zwischen zwei Untereinheiten in einem „aromatischen Kasten“ koordinieren, der hauptsächlich aus Tyrosin- und Tryptophanseitenketten besteht. Damit konnte die Bedeutung von Kation-π-Interaktionen bestätigt werden, die zuvor auf Grundlage ausgefeilter biophysikalischer Studien vorgeschlagen worden waren, bei denen markierte Aminosäuren zum Einsatz gekommen waren.^[81c] Eine Seitenwand der Ligandenbindungsstelle wird durch die so genannte C-Schleife gebildet, die beim Binden eines Agonisten wie eine Klappe schließt. Diese flexible C-Schleife trägt auch eine Cysteinidisulfidbrücke, die jedoch nicht mit der so genannten Cys-Schleife verwechselt werden sollte, die sich näher an der Membran befindet.

Zusätzlich wurden andere Liganden für pLGICs, z.B. Epibatidin (ein Agonist von nAChR),^[81d] Lobelin (ein ge-

mischer Agonist/Antagonist von nAChR^[81d] und Strychnin (ein Antagonist von GlyR)^[82] mit A-AChBP cokristallisiert. Diese Strukturen zeigten, dass die C-Schleife tatsächlich als Sensor für Liganden fungiert, wobei der Grad der Schließung des Zwischenraumspalts davon abhängt, ob ein Agonist oder Antagonist gebunden hat. Wie diese Bewegung mechanisch mit dem Öffnen des Kanals gekoppelt ist, bleibt aber immer noch Gegenstand einer intensiven Debatte.

10. Lichtempfindliche pentamere ligandengesteuerte Ionenkanäle

Der nikotinische Acetylcholinrezeptor ist in den letzten Jahrzehnten intensiv studiert worden, da er der erste ligan-dengesteuerten Ionenkanal war, der als Protein isoliert und charakterisiert werden konnte.^[17c] Er tritt in hoher Konzentration in den elektrischen Organen bestimmter Fischarten auf, z.B. im Rochen *Torpedo electrophorus* oder dem Aal *Electrophorus electricus*, weshalb er mit biophysikalischen Methoden studiert werden konnte, die auf andere Rezeptortypen mangels Material einfach nicht anwendbar waren. Vermutlich ist das auch der Grund, warum nAChR der erste Rezeptor war, der lichtempfindlich gemacht werden konnte, und zwar sowohl mit PCLs als auch mit PTLs.^[83] Erstaunlicherweise gelang dies schon in den frühen 1970er Jahren, lange bevor molekulares Klonieren, heterologe Expression, moderne Strukturbioologie oder die Patch-Clamp-Elektrophysiologie eingeführt worden waren. Drei Jahrzehnte mussten vergehen, bevor dies auch mit anderen Rezeptoren gelang!

Der PCL, der in diesem Fall verwendet wurde, heißt Bis-Q und besteht aus einem Azobenzol, flankiert von zwei quartären Ammoniumionen (Q). Dieses einfache und symmetrische Molekül fungiert als lichtschaltbares Derivat des natürlichen Agonisten Acetylcholin.^[83] *trans*-Bis-Q aktiviert nAChRs des *Electrophorus electricus*, während das entsprechende *cis*-Isomer eine geringere Wirkung hat. Die Aktivität der beiden Isomere wurde durch Messungen des Membranpotentials von *Electrophorus*-Elektroplaques bestimmt. Das System wurde später auch genutzt, um Öffnungs- und Schließkinetiken von nAChRs zu messen.^[84]

Das entsprechende PTL-System konnte durch sorgfältige Überlegungen und ein wenig Glück etabliert werden, denn der native Rezeptor konnte ohne molekularbiologische Eingriffe verwendet werden. Zufälligerweise haben die α -Untereinheiten der nAChRs an der C-Schleife eine Disulfidbrücke, die in unmittelbarer Nähe der Ligandenbindungsstelle liegt (Abbildung 16). Diese Disulfidbrücke kann ohne allzu großen Einfluss auf die Rezeptorfunktion reduziert werden, was Thiole für die Anknüpfung des PTL liefert.^[83] Der PTL war ein Azobenzolbenzylbromid QBr, das auch das für die Rezeptoraktivierung nötige quartäre Ammoniumionen trägt. Praktischerweise ließ sich QBr durch eine kleine Modifikation der für die Herstellung von Bis-Q verwendeten Vorschrift synthetisieren. Nach kovalenter Verknüpfung von QBr mit nAChRs ließen sich *Electrophorus*-Electroplaques, Froschmuskeln und sphärische Muskelzellverbände (myo-balls) aus Ratten mit Licht stimulieren.^[85]

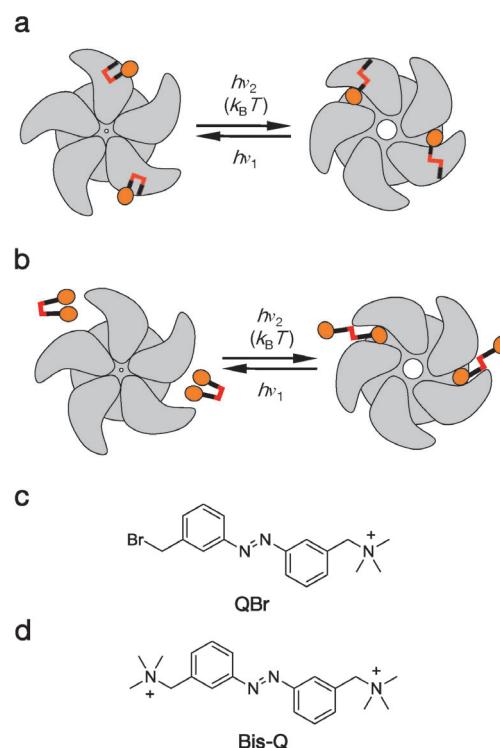


Abbildung 16. Der lichtschaltbare nikotinische Acetylcholinrezeptor. Schematische Darstellung eines a) PTL, der reversibel die nAChR-Aktivität steuert, und b) eines PCL, der nAChRs kontrolliert. c) Struktur des PTL QBr und d) des PCL Bis-Q.

Natürlich konnte man in den 1970er und 1980er Jahren den lichtaktivierten nAChR nicht heterolog exprimieren und mit genetischen Methoden adressieren, weshalb er nie für die Kontrolle von APs verwendet wurde. Bis-Q wurde hauptsächlich als ein Werkzeug zum Studium der inhärenten Eigenschaften von nAChRs angesehen und weniger als ein praktisches Hilfsmittel zur Kontrolle von Nervenaktivität und dem Verhalten von Tieren. Nun, da moderne Methoden der Molekularbiologie und detaillierte Kristallstrukturen verfügbar sind, ist es aber sehr wahrscheinlich, dass lichtempfindliche Acetylcholinrezeptoren bald wieder in der Literatur auftauchen werden und in der optochemischen Genetik eingesetzt werden. Darauf hinaus sollte man PCLs und PTLs auch für andere pLGICs entwickeln.

11. Eine Fülle von Targets

Nach dem bisher Gesagten ist klar, dass bereits Rezeptoren aus diversen Strukturklassen mit PCLs und PTLs lichtempfindlich gemacht werden konnten. Die große Mehrzahl möglicher Ziele, die strukturell und pharmakologisch ausreichend charakterisiert worden sind, ist diesbezüglich aber noch nicht untersucht worden. Dementsprechend gibt es reichlich Gelegenheit, die optochemische Genetik dieser Targets zu entwickeln. Beispielsweise eröffnen die strukturellen und funktionellen Ähnlichkeiten zwischen spannungsgesteuerten Kalium- (K_V) und Natrium- (Na_V) sowie Calciumkanälen (Ca_V) die Möglichkeit, PCLs auch für letztere zu

generieren. Zudem haben Na_v - und Ca_v -Kanäle ihre eigene spezielle Pharmakologie, die bei der Entwicklung selektiver PCLs genutzt werden könnte. Die langerwartete Kristallstruktur eines Na_v -Kanals wurde vor Kurzem veröffentlicht und könnte das Design entsprechender PTLs sehr erleichtern.^[86]

Selbst wenn man sich auf Rezeptoren mit muschelschalenartigen LBDs beschränkt, gäbe es eine Vielzahl interessanter Kandidaten. Muschelschalenartige Ligandenbindungsdomänen sind bereits früh in der Evolution entstanden und bieten ein hervorragendes Beispiel dafür, wie ein erfolgreiches Strukturmotiv immer wieder in unterschiedlichen funktionellen Zusammenhängen eingesetzt wurde.^[87]

Ursprünglich entwickelten sich die muschelschalenartigen LBDs als bakterielle periplasmatische Bindepoteine (z.B. das Maltosebindungsprotein oder Aminosäurenbindungsproteine). Im Laufe der Evolution wurde sie dann als funktionelle Domänen in prokaryotische und eukaryotische Transmembranproteine integriert. Zuerst wurden sie wohl von bakteriellen ABC-Transportern, die mit löslichen periplasmatischen Proteinen zunächst auf nichtkovalente Art interagierten, eingefangen. Anschließend etablierten sich die muschelartigen LBDs als Komponenten von Ionenkanälen, z.B. ionotropen Glutamatrezeptoren. Dazu gehören diverse prokaryotische glutamatgesteuerte Kanäle,^[71] ein pflanzlicher Rezeptor^[88] und ein Rezeptor, der kürzlich in einem eukaryotischen Rädertierchen gefunden wurde.^[89] Wie in Abschnitt 7 diskutiert, haben Glutamatrezeptoren schließlich eine entscheidende Rolle in der schnellen synaptischen Transmission höherer Tiere eingenommen. Die Muschelschalen-LBD tritt ebenfalls in metabotropen Glutamatrezeptoren (mGluRs) auf, die zur GPCR-Familie C gehören.^[90] Diese große GPCR-Klasse hat viele neurophysiologische Funktionen und umfasst neben den metabotropen Glutamatrezeptoren auch GABA_B -Rezeptoren^[91] sowie T1R-Geschmacksrezeptoren.^[92] Die LBDs mehrerer mGluRs wurden röntgenkristallographisch im Detail untersucht, und ihre Pharmakologie ist sehr gut entwickelt (Abbildung 17).^[93] Daher sind die mGluRs logische Ziele für die nächste Phase der optochemischen Genetik. Schließlich wurden muschelschalenartige LBDs auch in bestimmten rezeptorgebundenen Enzymen gefunden. Diese sind neben den Ionenkanälen und GPCRs die dritte große Klasse von Rezeptoren in der Signaltransduktion. Ein Beispiel dafür ist der ANP-Rezeptor, dessen LBD mit dem atrialen natriuretischen Peptid cokristallisiert wurde (Abbildung 17).^[94] Selbst unter den Rezeptortyrosinkinasen gibt es Mitglieder, die eine muschelartige LBD aufweisen.^[95]

Bisher wurde noch keine gesamte Röntgenstruktur eines zur Familie C gehörigen GPCRs, die auch die Transmembrandomäne enthält, publiziert (Abbildung 18). Dagegen gibt es seit neuestem mehrere Strukturen von GPCRs der Familie A. Diese Rezeptoren entsprechen der größten Klasse von GPCRs und enthalten eine Ligandenbindungstasche, die mehr oder weniger tief in die Membran eingebettet ist. Zu ihnen gehören wichtige pharmakologische Targets wie die adrenergen Rezeptoren (z.B. $\beta_2\text{A}$),^[96] die Adenosinrezeptoren (z.B. $\text{A}_{2\text{A}}$, der von Koffein antagonisiert wird)^[11c] und die Dopaminrezeptoren (z.B. D3).^[11d] Ein weiterer prominenter

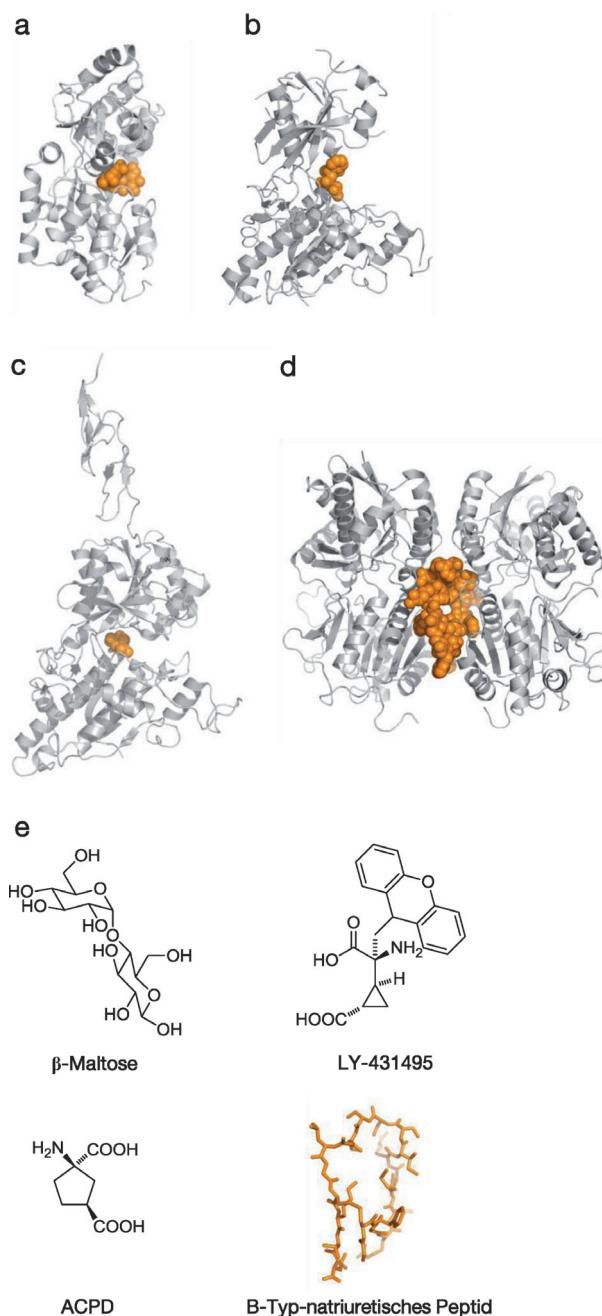


Abbildung 17. Muschelschalenartige LBDs als mögliche Ziele für die optochemische Genetik. a) Das Maltosebindungsprotein, ein typisches periplasmatisches Bindungsprotein (pdb-Code: 1ANF). b) Die extrazelluläre LBD von mGluR3 mit einem Agonisten (pdb-Code: 2E4X). c) Die extrazelluläre LBD von mGluR1 mit einem Antagonisten (pdb-Code: 3KS9). d) Die LBD des ANP Rezeptors, ein rezeptorgebundenes Enzym (pdb-Code: 1YK0). e) Die chemischen Strukturen von Liganden für muschelschalenartige LBD-Rezeptoren.

Vertreter dieser Familie ist der natürliche Photorezeptor Rhodopsin, dem eine entscheidende Rolle im tierischen Sehprozesses zukommt.^[11b] Der Photoschalter Retinal ist darin in seiner inaktiven 11-*cis*-Form an Rhodopsin kovalent gebunden. Durch einfallendes Licht photoisomerisiert Retinal zu seiner aktiven all-*trans*-Form, woraufhin es hydrolysiert und rezykliert wird, anstatt reversibel zu binden. In ge-

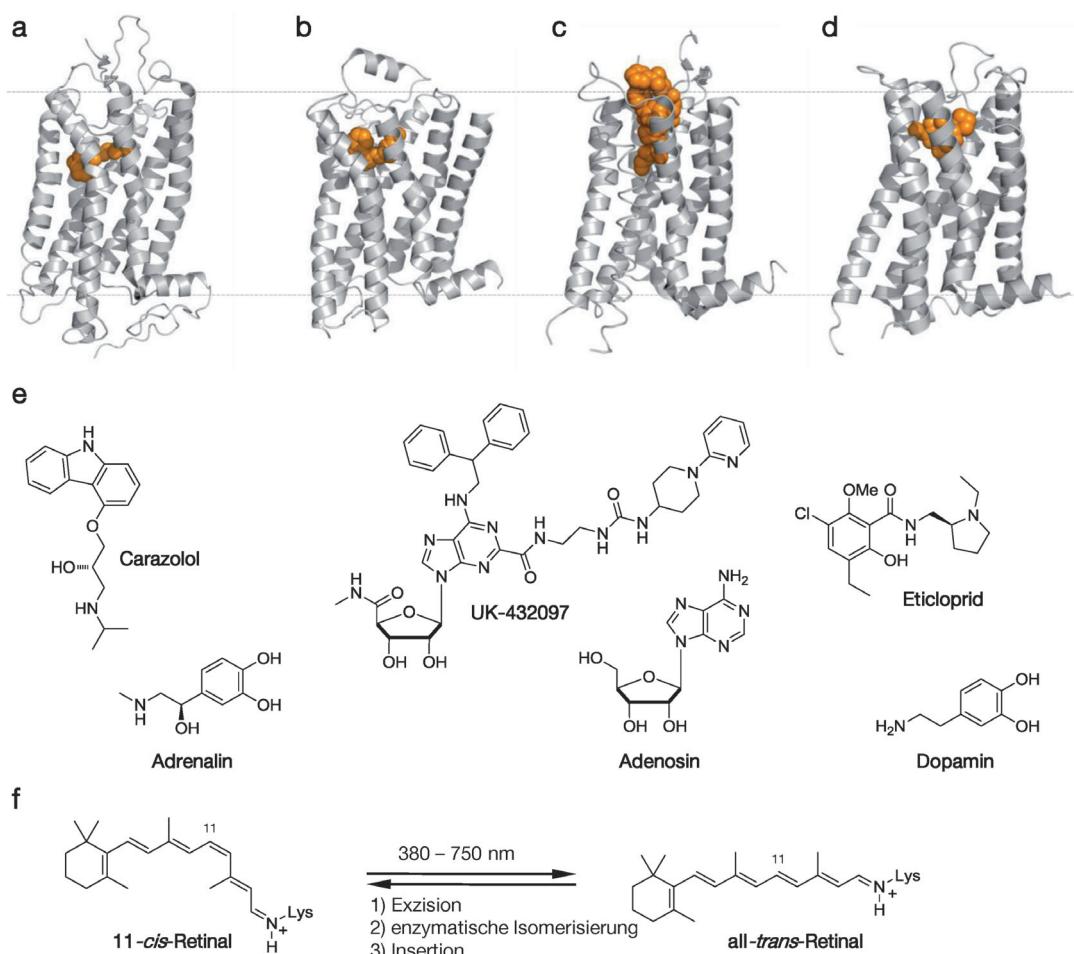


Abbildung 18. Familie-A-GPCRs als mögliche Ziele der optochemischen Genetik. a) Rhodopsin, ein natürlicher Photorezeptor mit einem kovalent gebundenen Photoschalter (pdb-Code: 1U19). b) Der β_2 -adrenerge Rezeptor mit dem inversen Agonisten Carazolol (pdb-Code: 2RH1). c) Der A_{2A}-Adenosinrezeptor mit dem Agonisten UK-432097 (pdb-Code: 2QAK). d) Der D₃-Dopaminrezeptor mit dem Antagonisten Eticloprid (pdb-Code: 3PBL). Proteindomänen, die nur für die Kristallisation angefügt wurden, sind hier ausgeblendet. e) Chemische Strukturen der cokristallisierten und endogenen Liganden der oben abgebildeten Rezeptoren. f) Isomerisierung von 11-cis-Retinal zu all-trans-Retinal in Rhodopsin.

wisser Weise ähnelt es damit einem PTL. Prinzipiell ist damit denkbar, dass gut charakterisierte Liganden für Rezeptoren der Klasse A durch PTLs oder PCLs ersetzt werden könnten, womit man die GPCRs in Photorezeptoren umbauen könnte.

Trimere Ionenkanäle sind in physiologischer Hinsicht eine äußerst interessante Klasse, die auch bereits teilweise kristallographisch untersucht wurde (Abbildung 19). Zu ihnen gehören die purinergen Rezeptoren (P2X-Rezeptoren), die säuredetektierenden Rezeptoren (ASICs) und die epithelialen Natriumkanäle (ENaCs). Die ionotropen P2X-Rezeptoren sind nichtselektive Kationenkanäle, die durch extrazelluläres Adenosin-5'-triphosphat (ATP) aktiviert werden. Sie sind im Nerven- und Immunsystem weit verbreitet und in zahlreichen neurologischen Funktionen wie der Schmerzwahrnehmung involviert.^[97]

Die erste Kristallstruktur von einem P2X-Rezeptor, nämlich von P2X₄ aus dem Zebrafisch, wurde in der geschlossenen Form mit einer Auflösung von 3.1 Å gelöst.^[13] Diese Struktur bestätigte die trimere Kanalarchitektur und lieferte wichtige Einblicke in die Kanalpore. Die Position der ATP-Bindungstasche wurde jeweils zwischen zwei Unterein-

heiten auf der extrazellulären Seite des Rezeptors vermutet. Jedoch wurde die P2X₄-Struktur ohne ATP oder einen Antagonisten (z. B. das Azobenzol PPADS) aufgeklärt, sodass der genaue Ligandenbindungsmodus ungeklärt bleibt.

Ein P2X-Rezeptor, nämlich P2X₂, spielte eine besondere Rolle bei der Entwicklung der optochemischen Genetik. Nach heterologer Expression in Neuronen konnte dieser Kationenkanal mit photoaktivierbarem ATP optisch stimuliert werden, wodurch neurale Aktivität ausgelöst wurde. Diese 2003 publizierte Arbeit steht damit ganz am Anfang der Optogenetik. Da ATP schnell hydrolysiert wird, sogar im extrazellulären Raum, konnte die Photostimulation mit guter zeitlicher Auflösung wiederholt eingesetzt werden. Nebenbei sei angemerkt, dass photoaktivierbares ATP einer der ersten Vertreter seiner Art war.^[35]

ASIC-Kanäle gehören zur Degenerin/epithelialer-Natriumkanal(Deg/ENaC)-Familie. Es handelt sich bei ihnen um ligandengesteuerte trimere Kationenkanäle, die von extrazellulären Protonen aktiviert werden und eine zehnfach höhere Leitfähigkeit von Natrium gegenüber der von Kalium zeigen. ASIC-Isoformen sind im zentralen und peripheren

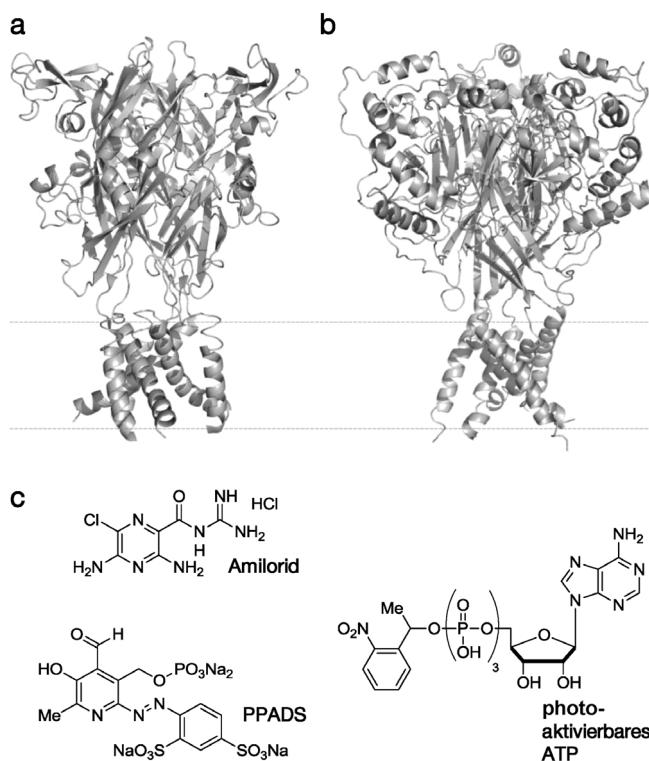


Abbildung 19. Trimere Ionenkanäle als mögliche Ziele für die optochemische Genetik. a) Der ASIC1-Kanal (pdb-Code: 3HGC). b) Der P2X₄-Rezeptor (pdb-Code: 3H9V). c) Wirkstoffe, die an trimeren Ionenkanälen wirken. Amilorid: Blocker von ASIC- und ENaC-Kanälen. PPADS: ein Antagonist von purinergen Rezeptoren. Photoaktivierbares ATP: ein CL für P2X₂-Rezeptoren.

Nervensystem von Säugetieren anzutreffen. Sie üben wichtige physiologische Funktionen aus, z.B. bei der Detektion von Gewebsazidosen, die bei mangelnder Durchblutung auftreten.^[98] Zwei Kristallstrukturen von homotrimeren ASIC-Kanälen wurden in den letzten Jahren veröffentlicht.^[99]

Leider gibt es keine kristallographischen Daten zum ENaC-Kanal, der einen heterotrimeren Kanal bildet. Unter physiologischen Bedingungen ist er konstitutiv geöffnet und äußerst selektiv für Natriumionen. Er spielt eine Schlüsselrolle in der Wahrnehmung des Salzgeschmacks und in der Natriumreabsorption, was ihn zum pharmakologischen Ziel vielverwendeter Diuretika wie Amilorid macht.^[100]

Transientes-Rezeptor-Potential-Kanäle (TRP-Kanäle) wurden als wichtige molekulare Akteure in der Sinneswahrnehmung identifiziert.^[101] Sie bilden tetramere Kationenkanäle, die durch eine Reihe verschiedener Reize, einschließlich Temperatur und Liganden, aktiviert werden. Ein bekanntes Mitglied dieser Rezeptorfamilie ist TRPV1, der durch Hitze und Capsaicin, die scharfe Komponente der Chilischote, aktiviert wird.^[102] In einer der ersten Anwendungen der optochemischen Genetik wurde TRPV1 heterolog in Neuronen exprimiert und durch Bestrahlung von photoaktivierbarem Capsaicin stimuliert (Abbildung 4b,c).^[35]

TRP-Kanäle sind nicht nur für die Wahrnehmung von Wärme und Kälte verantwortlich, sondern sind möglicherweise auch in die Druckwahrnehmung involviert.^[101] Damit spielen sie vermutlich beim Berührungssinn, dem Gleichge-

wichtssinn, der Schmerzwahrnehmung, der Blutdruckregulation und dem Hörprozess eine wichtige Rolle.^[103] Die optische Kontrolle von Drucksensoren könnte in der Tat von großem Interesse sein. Eine solche Kontrolle ist noch nicht mit TRP-Kanälen erreicht worden, aber dass dies im Prinzip möglich ist, konnte mit einem vergleichsweise einfachen bakteriellen Rezeptor aus *Mycobacterium tuberculosis* gezeigt werden (Abbildung 20).^[104] Dieser homopentamere Kanal wurde in

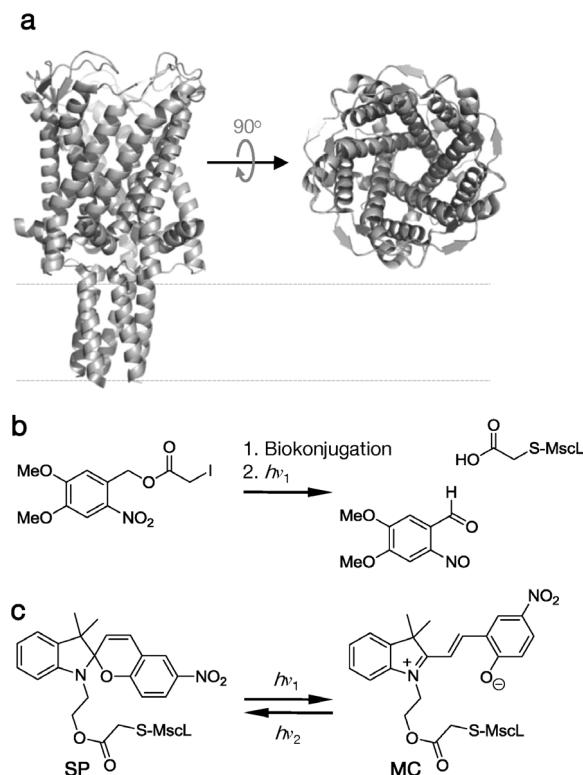


Abbildung 20. Photosensibilisierung eines bakteriellen mechanosensitiven Kanals. a) Die Struktur von MsCL in seiner geschlossenen Form in Seiten- und Aufsicht (pdb-Code: 2OAR). b) Eine photoaktivierbare Säure, die verwendet wird, um MsCL zu öffnen. c) Die SP- und MC-Form des Lichtschalters, mit dem MsCL reversibel lichtgesteuert werden kann.

seiner geschlossenen Form röntgenkristallographisch analysiert.^[105] Sobald die mechanische Spannung der den Kanal umgebenden Membran einen bestimmten Wert übersteigt, öffnet dieser eine sehr große Pore, was wie ein Ventil wirkt und den osmotischen Druck im Bakterium abbaut. Fünf hydrophobe Aminosäurereste bilden im geschlossenen Zustand einen Ring, der die Pore verschließt und keinen Strom von Ionen und anderen Stoffen zulässt. Detaillierte biophysikalische Studien zeigten, dass der Austausch dieser hydrophoben Aminosäuren gegen geladene Aminosäuren einen konstitutiv offenen Kanal generiert, was vermutlich auf elektrostatische Abstoßung zurückzuführen ist.^[106]

In einem ersten Experiment zur Photosensibilisierung von MsCL wurde eine der hydrophoben Aminosäuren durch ein Cystein ersetzt. Anschließend wurde eine photoaktivierbare Carbonsäure kovalent mit diesem Cystein verknüpft. Durch Bestrahlung mit UV-Licht wurde die Schutzgruppe abge-

spalten, sodass die resultierende freie Ladung den Kanal öffnete. In einem zweiten Schritt wurden die photoaktivierbaren Säuren durch einen kovalent gebundenen Spiropyran/Merocyanin(SP/MC)-Photoschalter ersetzt. Durch Schalten zwischen dem nichtpolaren SP und dem hochpolaren MC konnte der Kanal geöffnet und geschlossen werden, was für einige Zyklen möglich war.^[104] Dieses System wurde als „Nanoventil“ für Wirkstofflieferung entwickelt und ist eine schöne Demonstration eines Rezeptors, der sowohl mit PCLs als auch mit PTLs optisch kontrolliert werden kann. Im Hinblick auf die Neurobiologie hat dieser Ansatz jedoch keine weitere Bedeutung. Interessanterweise wurden in einer anderen Studie photoschaltbare Lipide verwendet, um die mechanische Membranspannung mit Licht zu ändern und damit den MsCL-Kanal zu öffnen.^[107] In der Tat könnten sich photoschaltbare Lipide als ein weiteres allgemeines Verfahren erweisen, mit dem man Transmembranproteine durch Licht kontrollieren kann.

12. Zusammenfassung und Ausblick

Aus den obigen Betrachtungen wird deutlich, dass es keinen Mangel an Proteinen gibt, die sich mit optochemischer Genetik manipulieren lassen. Dies gilt auch für die natürlich auftretenden Photorezeptoren, z.B. die Kanalrhodopsine, deren spektrale Eigenschaften durch künstliche Photoschalter optimiert werden könnten. Allerdings könnte man sich auch viele Varianten synthetischer Moleküle ausdenken, die man mit natürlicherweise „blind“ Rezeptoren verbinden kann. Die bisher präsentierten PTLs und PCLs waren immer Agonisten oder Kanalblocker, aber es sollte auch möglich sein, sie zu Antagonisten bzw. Kanalöffnern umzubauen. Zusätzlich ist es denkbar, Vernetzungsagentien zu entwerfen, die an zwei Cysteinen angebracht werden könnten.^[108] Dies wurde mit Erfolg dazu verwendet, den Helixanteil von Peptiden zu steuern^[108b,109] und konnte bereits zur Kontrolle eines Proteins eingesetzt werden.^[110] Denkbar wäre die Übertragung dieses Ansatzes auf Transmembranrezeptoren, was eine weitere Methode zur optischen Kontrolle neuraler Aktivität liefern würde.

Andere Photoschalter, wie Hemithioindigos oder die Spiropyran-Merocyanine könnten im Hinblick auf eine Anwendung bei neurobiologischen relevanten Rezeptoren systematisch untersucht werden. Aber selbst wenn die Azobenzole die Photoschalter der Wahl blieben, gäbe es viele Wege, ihre photophysikalischen und thermischen Eigenschaften zu optimieren. Es besteht z.B. Bedarf, das Aktionsspektrum der rotverschobenen K_v-Kanalblocker in Abbildung 10 noch weiter in den roten Wellenlängenbereich zu verschieben. Vielleicht könnte man die Absorption von substituierten Azobenzolen sogar bis in den Nahinfrarotbereich verrücken, wodurch man dem von Sir Francis gesteckten, anspruchsvollen Ziel näher käme. Selbst wenn dies nicht gelänge, könnte man als Alternative – anstelle eines Photoschalters, der über ein einzelnes Photon aktiviert wird – einen Zweiphotonenschalter entwerfen, der auch die Aktivierung in sehr kleinen Volumina ermöglichen würde. Zweiphotonenschalter könnten z.B. dazu genutzt werden, einen einzelnen dendritischen

Dorn (dendritic spine) zu stimulieren, der simultan mit Zweiphotonenfluoreszenzbildgebung visualisiert werden könnte.

Licht ist jedoch nicht der einzige nichtnatürliche Stimulus, der für die Aktivierung von Transmembranrezeptoren in Frage kommt. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, einen ligandengesteuerten Ionenkanal so umzuprogrammieren, dass er nur von einem orthogonalen Liganden aktiviert wird, der sonst keine pharmakologische Wirkung zeigt. Diese Strategie kam bereits mit Erfolg an Kinassen und G-Proteinen zum Einsatz und sollte auch auf andere Rezeptoren übertragbar sein.^[111] Man kann sogar über Rezeptoren spekulieren, die durch elektromagnetische Wechselfelder oder durch statische Magnetfelder tief im Gewebe aktiviert werden könnten.

Für die absehbare Zukunft wird jedoch Licht weiterhin die entscheidende Rolle für die Kontrolle neuraler Aktivität einnehmen. Techniken, die es ermöglichen, in kürzester Zeit Wellenlängen und Intensitäten von Licht zu modulieren, wurden bereits entwickelt. Auf dem Weg der Entwicklung befinden sich Methoden, die es ermöglichen, tief in verschiedene Gewebe einzudringen, um mit hoher zeitlicher und räumlicher Auflösung mit Licht zu bestrahlen und zu detektieren. Zu diesen Techniken gehören z.B. „digital micromirror arrays“^[112] und die Optische-Glasfaser-Mikroendoskopie (fiber-optic microendoscopy).^[113] Gleichzeitig wird das gewebsspezifische Kodieren von genetischer Information durch virale Transfektion immer präziser und effektiver, wovon vor allem die PTL-Strategie profitieren wird. Diese Entwicklungen lassen darauf schließen, dass in Zukunft viele neurobiologische Fragen mithilfe der optochemischen Genetik beantwortet werden können.

Vieles könnte man z.B. über die Rolle von Rezeptoren und ihren Isoformen lernen, denn die optische Kontrolle genetisch definierter Rezeptorsubtypen könnte Ihre individuellen Beiträge zu physiologischen Prozessen klären (siehe Abbildung 5). Bisher wurde diese Strategie nur ansatzweise für verschiedene K_v-Kanalsubtypen verfolgt (siehe Abschnitt 6). Wir gehen aber davon aus, dass der optochemische Ansatz noch viel breitere Anwendung finden kann. Die traditionelle Pharmakologie scheitert oft an der fehlenden Subtypselektivität, und genetische Knockout-Strategien liefern nicht selten unbrauchbare Ergebnisse infolge kompensatorischer Effekte. Deshalb wären Knock-in-Tiere, bei denen der endogene Rezeptor durch eine Cysteinmutante zum Anbringen von PTLs ersetzt wird und dann konditionell mit Licht aktiviert werden kann, von großem Nutzen.

Über neurobiologische Grundlagenforschung hinaus, in der es darum geht, vorhandene Systeme durch systematische Störung aufzuklären, könnte man die optochemische Genetik auch dazu nutzen, eine Art „synthetischer Neurobiologie“ zu schaffen. Hier liegt das Schwergewicht auf der Neuverdrahtung des Nervensystems und der Veränderung seiner Komponenten, um damit neue Formen der neuronalen Verrechnung und Sinneswahrnehmung zu kreieren. Zum Beispiel könnte man die molekularen Rezeptoren, die für das Empfinden von Temperatur und Schmerz verantwortlich sind, zu Photorezeptoren umprogrammieren. Die Mechanorezeptoren, die für unseren Hörsinn und unseren Gleichgewichtssinn verant-

wortlich sind, könnte man genauso verändern. Vielleicht ist der Tag nicht fern, an dem Geschmacks- und Geruchsrezeptoren mit Licht stimuliert werden können!

Dies mag ein wenig befremdlich klingen, aber eine solche Herangehensweise könnte durchaus zu nützlichen medizinischen Therapien führen. Ein primäres therapeutisches Ziel ist dabei die Retina, die mit Licht, Viren und kleinen Molekülen leicht zu erreichen ist. Bei vielen Formen von Blindheit, z.B. bei Retinitis Pigmentosa, sterben die Photorezeptorzellen, d.h. die Stäbchen und Zapfen, ab, aber die restlichen Zellschichten bleiben weitgehend intakt. Deren Neuronen exprimieren viele Rezeptortypen, die mit PTLs und PCLs dazu „überredet“ werden könnten, lichtempfindlich zu werden. In der Tat waren erste Versuche, die optochemische Genetik zur Wiederherstellung des Sehprozesses zu nutzen, erfolgreich (Abbildung 21). In einer aktuellen Studie wurden retinale Ganglienzellen von blinden Mäusen mit LiGluR durch einen adenoassoziierten Virus (AAV) transfiziert. Nach der Injektion von MAG-0 in den Glaskörper konnte die Aktivität dieser Neuronen (Kommunikation mit dem Gehirn über den optischen Nerv) durch Licht kontrolliert werden.^[114] Diese Information wurde an die Sehrinde weitergegeben, und als Konsequenz wurden der Pupillenreflex und ein natürliches

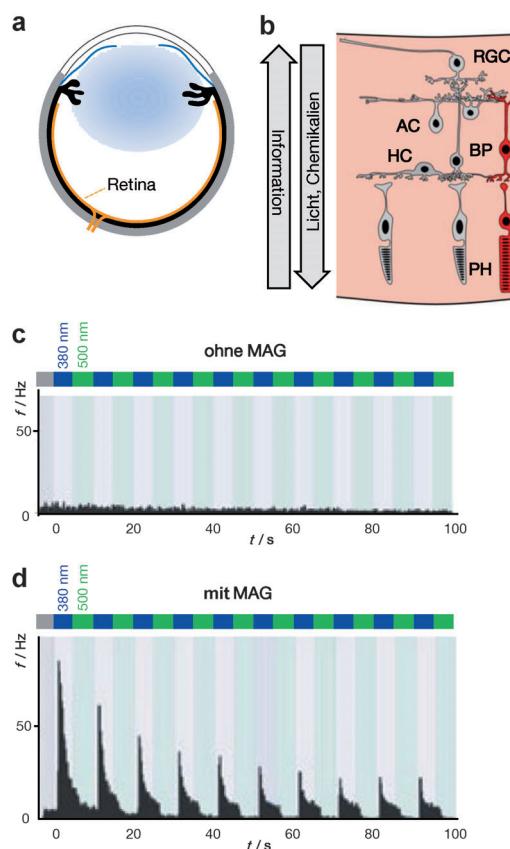


Abbildung 21. Wiederherstellung von visuellen Antworten mit synthetischen Photoschaltern. a) Querschnitt eines Mausauges mit seiner Retina (orange). b) Schematisches Diagramm der Retina, das ihren geschichteten Aufbau zeigt. RGC: retinale Ganglienzellen, AC: amakrine Zellen, BP: bipolare Zellen, HC: horizontale Zellen, PH: Photorezeptorzellen (Stäbchen und Zapfen). c), d) Elektrische Aktivität von mit LiGluR transfizierten RGCs vor (c) und nach Zugabe von MAG-0 (d).

Lichtmeidungsverhalten wiederhergestellt. Erste Erfahrungen mit PCLs sind ebenfalls vielversprechend und lassen klinische Anwendungen erhoffen.

Wir finden es erstaunlich, dass wir uns nur sieben Jahre nach den ersten Versuchen, alten Rezeptoren neue Tricks beizubringen, mit der Wiederherstellung des Sehprozesses beschäftigen. Dieses Tempo wird sich wahrscheinlich sogar beschleunigen, da immer neue molekulare Targets auftauchen und sich immer mehr Neurobiologen, Biophysiker und Chemiker diesem Feld widmen. Wir sind davon überzeugt, dass dieses ausgesprochen interdisziplinäre Forschungsgebiet noch viele weitere nützliche Techniken hervorbringen wird, mit denen sich neurale Netzwerke studieren oder Krankheiten des Nervensystems heilen lassen. Aber über ihre schlichte Nützlichkeit hinaus wird die optochemische Genetik immer auch eine faszinierende intellektuelle Übung bleiben – und ein schönes Beispiel dafür, wie sich die Komplexität des Lebens mit vergleichsweise einfacher Synthesechemie zähmen lässt (Abbildung 22).

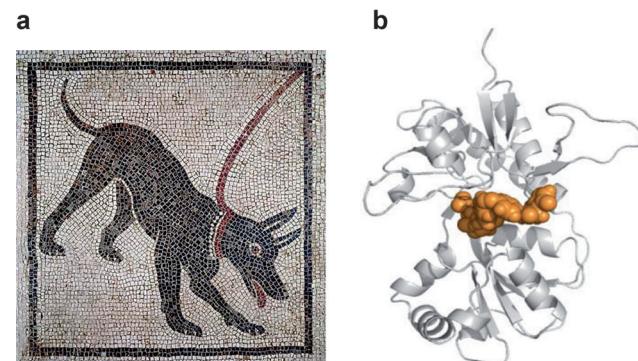


Abbildung 22. Das Leben an die Leine nehmen. a) Ein Hund (ein natürliches Geschöpf, leicht modifiziert durch Zucht) an einer Hundeleine (ein recht krudes Mittel, um sein Verhalten zu kontrollieren – mit gemischten Erfolg). b) LiGluR (ein komplexer Rezeptor, leicht modifiziert durch genetische Manipulation) an einer vergleichsweise einfachen synthetischen Leine.

13. Addendum (10. November 2011)

Die in Abschnitt 12 erwähnten orthogonalen Liganden wurden kürzlich für pentamere ligandengesteuerte Ionenkanäle vorgestellt.^[115]

14. Abkürzungen

AMPA	2-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropan-säure
AP	Aktionspotential
Ca _v	spannungsgesteuerter Calciumkanal
CL	photoaktivierbarer Ligand
GABA	γ-Aminobuttersäure
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
K _v	spannungsgesteuerter Kaliumkanal
MscL	Mechanoempfindlicher Kanal aus <i>M. Tuberculosis</i> mit großer Leitfähigkeit

Na _v	spannungsgesteuerter Natriumkanal
NMDA	Methyl-D-aspartat
pLGIC	pentamerer ligandengesteuerter Ionenkanal
PTL	photoschaltbarer angeleinter Ligand
PCL	photochromer Ligand
SPMC	Spiropyran/Merocyanin-Photoschalter
TEA	Tetraethylammoniumion
TRPV1	Transientes-Rezeptor-Potential-Kanal, z.B. der Subtyp V1

Wir möchten uns bei unseren langjährigen Kooperationspartnern Ehud Isacoff (UC Berkeley) und Richard Kramer (UC Berkeley) bedanken. Die meisten hier vorgestellten Systeme wurden in enger Zusammenarbeit mit ihren Arbeitsgruppen entwickelt. Dank gebührt auch Herwig Baier (früher UCSF, jetzt MPG für Neurowissenschaften, München), John Flannery (UC Berkeley) und Xiang Zhang (UC Berkeley) für die erfolgreiche Zusammenarbeit und die fruchtbaren Diskussionen, die wir in den vergangenen Jahren geführt haben. Nicht zuletzt ist der Erfolg der Arbeiten nur durch die entsprechende Finanzierung möglich, und somit gilt der Dank der Deutschen Forschungsgemeinschaft, der Europäischen Wissenschaftsgemeinschaft, den National Institutes of Health und der Studienstiftung des Deutschen Volkes.

Eingegangen am 11. Mai 2011
Online veröffentlicht am 23. November 2011

- [1] F. Crick, *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* **1999**, *354*, 2021–2025.
- [2] a) B. Feringa, *Molecular Switches*, Vol. 1, Wiley-VCH, Weinheim, **2001**; b) V. Balzani, M. Venturi, A. Credi, *Molecular Devices and Machines: A Journey into the Nanoworld*, 2. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim, **2008**.
- [3] M. Yoshida, E. Muneyuki, T. Hisabori, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2001**, *2*, 669–667.
- [4] T. A. Steitz, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9*, 242–253.
- [5] a) P. Cramer, E. Arnold, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2009**, *19*, 680–682; b) G. Orphanides, D. Reinberg, *Nature* **2000**, *407*, 471–475.
- [6] J. R. Kardon, R. D. Vale, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2009**, *10*, 854–865.
- [7] S. Choe, *Nat. Rev. Neurosci.* **2002**, *3*, 115–121.
- [8] a) K. Deisseroth, *Nat. Methods* **2011**, *8*, 26–29; b) S. Peron, K. Svoboda, *Nat. Methods* **2011**, *8*, 30–34; c) L. Sjulson, G. Miesenböck, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 1588–1602; d) F. Zhang, A. M. Aravanis, A. Adamantidis, L. de Lecea, K. Deisseroth, *Nat. Rev. Neurosci.* **2007**, *8*, 577–581.
- [9] a) P. Gorostiza, E. Y. Isacoff, *Science* **2008**, *322*, 395–399; b) R. H. Kramer, D. L. Fortin, D. Trauner, *Curr. Opin. Neurobiol.* **2009**, *19*, 544–552.
- [10] D. A. Doyle, J. Morais Cabral, R. A. Pfuetzner, A. Kuo, J. M. Gulbis, S. L. Cohen, B. T. Chait, R. MacKinnon, *Science* **1998**, *280*, 69–77.
- [11] a) D. M. Rosenbaum, C. Zhang, J. A. Lyons, R. Holl, D. Aragao, D. H. Arlow, S. G. Rasmussen, H. J. Choi, B. T. Devree, R. K. Sunahara, P. S. Chae, S. H. Gellman, R. O. Dror, D. E. Shaw, W. I. Weis, M. Caffrey, P. Gmeiner, B. K. Kobilka, *Nature* **2011**, *469*, 236–240; b) T. Okada, M. Sugihara, A. N. Bondar, M. Elstner, P. Entel, V. Buss, *J. Mol. Biol.* **2004**, *342*, 571–583; c) F. Xu, H. Wu, V. Katritch, G. W. Han, K. A. Jacobson, Z. G. Gao, V. Cherezov, R. C. Stevens, *Science* **2011**, *332*, 322–327; d) E. Y. Chien, W. Liu, Q. Zhao, V. Katritch, G. W. Han, M. A. Hanson, L. Shi, A. H. Newman, J. A. Javitch, V. Cherezov, R. C. Stevens, *Science* **2010**, *330*, 1091–1095.
- [12] A. I. Sobolevsky, M. P. Rosconi, E. Gouaux, *Nature* **2009**, *462*, 745–756.
- [13] T. Kawate, J. C. Michel, W. T. Birdsong, E. Gouaux, *Nature* **2009**, *460*, 592–598.
- [14] a) Y. Jiang, A. Lee, J. Chen, V. Ruta, M. Cadene, B. T. Chait, R. MacKinnon, *Nature* **2003**, *423*, 33–41; b) S. B. Long, E. B. Campbell, R. MacKinnon, *Science* **2005**, *309*, 897–903.
- [15] a) N. Unwin, *J. Mol. Biol.* **2005**, *346*, 967–989; b) R. J. Hilf, R. Dutzler, *Nature* **2008**, *452*, 375–379; c) R. J. Hilf, R. Dutzler, *Nature* **2009**, *457*, 115–118.
- [16] X. Chen, Q. Wang, F. Ni, J. Ma, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 11352–11357.
- [17] a) E. R. Kandel, J. Schwartz, T. Jessell, *Principles of Neural Science*, 4. Aufl., Elsevier, Dordrecht, **2000**; b) B. P. Bean, *Nat. Rev. Neurosci.* **2007**, *8*, 451–465; c) B. Hille, *Ionic Channels of Excitable Membranes*, 3. Aufl., Sinauer, Sunderland, **2001**.
- [18] C. Yue, Y. Yaari, *J. Neurosci.* **2004**, *24*, 4614–4624.
- [19] W. M. Oldham, H. E. Hamm, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9*, 60–71.
- [20] D. E. Nichols, C. D. Nichols, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 1614–1641.
- [21] S. W. Hell, *Nat. Methods* **2009**, *6*, 24–32.
- [22] W. Denk, J. H. Strickler, W. W. Webb, *Science* **1990**, *248*, 73–76.
- [23] J. N. Kerr, W. Denk, *Nat. Rev. Neurosci.* **2008**, *9*, 195–205.
- [24] B. V. Zemelman, G. A. Lee, M. Ng, G. Miesenböck, *Neuron* **2002**, *33*, 15–22.
- [25] a) G. Nagel, T. Szellas, W. Huhn, S. Kateriya, N. Adeishvili, P. Berthold, D. Ollig, P. Hegemann, E. Bamberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 13940–13945; b) E. S. Boyden, F. Zhang, E. Bamberg, G. Nagel, K. Deisseroth, *Nat. Neurosci.* **2005**, *8*, 1263–1268.
- [26] F. Zhang, L. P. Wang, E. S. Boyden, K. Deisseroth, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 785–792.
- [27] F. Zhang, L. P. Wang, M. Brauner, J. F. Liewald, K. Kay, N. Watzke, P. G. Wood, E. Bamberg, G. Nagel, A. Gottschalk, K. Deisseroth, *Nature* **2007**, *446*, 633–639.
- [28] a) A. Berndt, P. Schönenberger, J. Mattis, K. M. Tye, K. Deisseroth, P. Hegemann, T. G. Oertner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 7595–7600; b) V. Gradinaru, F. Zhang, C. Ramakrishnan, J. Mattis, R. Prakash, I. Diester, I. Goshen, K. R. Thompson, K. Deisseroth, *Cell* **2010**, *141*, 154–165; c) L. A. Gunaydin, O. Yizhar, A. Berndt, V. S. Sohal, K. Deisseroth, P. Hegemann, *Nat. Neurosci.* **2010**, *13*, 387–392; d) A. Berndt, O. Yizhar, L. A. Gunaydin, P. Hegemann, K. Deisseroth, *Nat. Neurosci.* **2009**, *12*, 229–234; e) F. Zhang, M. Prigge, F. Beyrière, S. P. Tsunoda, J. Mattis, O. Yizhar, P. Hegemann, K. Deisseroth, *Nat. Neurosci.* **2008**, *11*, 631–633.
- [29] B. Y. Chow, X. Han, A. S. Dobry, X. Qian, A. S. Chuong, M. Li, M. A. Henninger, G. M. Belfort, Y. Lin, P. E. Monahan, E. S. Boyden, *Nature* **2010**, *463*, 98–102.
- [30] V. Gradinaru, M. Mogri, K. R. Thompson, J. M. Henderson, K. Deisseroth, *Science* **2009**, *324*, 354–359.
- [31] V. Busskamp, J. Duebel, D. Balya, M. Fradot, T. J. Viney, S. Siegert, A. C. Groner, E. Cabuy, V. Forster, M. Seeliger, M. Biel, P. Humphries, M. Paques, S. Mohand-Said, D. Trono, K. Deisseroth, J. A. Sahel, S. Picaud, B. Roska, *Science* **2010**, *329*, 413–417.
- [32] A. B. Arrenberg, D. Y. Stainier, H. Baier, J. Huisken, *Science* **2010**, *330*, 971–974.
- [33] G. C. Ellis-Davies, *Nat. Methods* **2007**, *4*, 619–628.
- [34] J. Noguchi, A. Nagaoka, S. Watanabe, G. C. Ellis-Davies, K. Kitamura, M. Kano, M. Matsuzaki, H. Kasai, *J. Physiol.* **2011**, *589*, 2447–2457.
- [35] B. V. Zemelman, N. Nesnas, G. A. Lee, G. Miesenböck, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 1352–1357.

- [36] a) P. J. Alaimo, M. A. Shogren-Knaak, K. M. Shokat, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 360–367; b) S. L. Schreiber, *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6*, 1127–1152; c) B. R. Stockwell, *Nat. Rev. Genet.* **2000**, *1*, 116–125.
- [37] M. J. Keiser, V. Setola, J. J. Irwin, C. Laggner, A. I. Abbas, S. J. Hufeisen, N. H. Jensen, M. B. Kuijzer, R. C. Matos, T. B. Tran, R. Whaley, R. A. Glennon, J. Hert, K. L. Thomas, D. D. Edwards, B. K. Shoichet, B. L. Roth, *Nature* **2009**, *462*, 175–181.
- [38] a) M. E. Hahn, T. W. Muir, *Trends Biochem. Sci.* **2005**, *30*, 26–34; b) M. E. Hahn, T. W. Muir, *Trends Biochem. Sci.* **2005**, *30*, 26–34; c) M. A. Shogren-Knaak, P. J. Alaimo, K. M. Shokat, *Annu. Rev. Cell Biol.* **2001**, *17*, 405–433.
- [39] M. R. Banghart, M. Volgraf, D. Trauner, *Biochemistry* **2006**, *45*, 15129–15141.
- [40] F. Hamon, F. Djedaini-Pillard, F. Barbot, C. Len, *Tetrahedron* **2009**, *65*, 10105–10123.
- [41] P. Gorostiza, M. Volgraf, R. Numano, S. Szobota, D. Trauner, E. Y. Isacoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 10865–10870.
- [42] A. Mourot, M. Kienzler, M. Banghart, T. Fehrentz, F. Huber, M. Stein, R. H. Kramer, D. Trauner, *ACS. Chem. Neurosci.* **2011**, *2*, 536–543.
- [43] a) P. V. Chang, J. A. Prescher, M. J. Hangauer, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 8400–8401; b) J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 13–21; c) J. A. Prescher, D. H. Dube, C. R. Bertozzi, *Nature* **2004**, *430*, 873–877.
- [44] F. Tombola, M. M. Pathak, E. Y. Isacoff, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2006**, *22*, 23–52.
- [45] H. Wulff, N. A. Castle, L. A. Pardo, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2009**, *8*, 982–1001.
- [46] Y. Jiang, A. Lee, J. Chen, M. Cadene, B. T. Chait, R. MacKinnon, *Nature* **2002**, *417*, 515–522.
- [47] a) M. Nishida, M. Cadene, B. T. Chait, R. MacKinnon, *EMBO J.* **2007**, *26*, 4005–4015; b) M. Nishida, R. MacKinnon, *Cell* **2002**, *111*, 957–965; c) S. Pegan, C. Arrabit, W. Zhou, W. Kwiatkowski, A. Collins, P. A. Slesinger, S. Choe, *Nat. Neurosci.* **2005**, *8*, 279–287.
- [48] N. Shi, S. Ye, A. Alam, L. Chen, Y. Jiang, *Nature* **2006**, *440*, 570–574.
- [49] a) T. Hoshi, W. N. Zagotta, R. W. Aldrich, *Science* **1990**, *250*, 533–538; b) W. N. Zagotta, T. Hoshi, R. W. Aldrich, *Science* **1990**, *250*, 568–571.
- [50] a) L. G. Cuello, V. Jogini, D. M. Cortes, A. C. Pan, D. G. Gagnon, O. Dalmas, J. F. Cordero-Morales, S. Chakrapani, B. Roux, E. Perozo, *Nature* **2010**, *466*, 272–275; b) L. G. Cuello, V. Jogini, D. M. Cortes, E. Perozo, *Nature* **2010**, *466*, 203–208; c) L. Kiss, S. J. Korn, *Biophys. J.* **1998**, *74*, 1840–1849.
- [51] C. Hammond, *Cellular and Molecular Neurophysiology*, 3. Aufl., Elsevier Science, Dordrecht, **2008**.
- [52] a) K. G. Chandy, M. Cahalan, M. Pennington, R. S. Norton, H. Wulff, G. A. Gutman, *Toxicol.* **2001**, *39*, 1269–1276; b) M. A. Eriksson, B. Roux, *Biophys. J.* **2002**, *83*, 2595–2609.
- [53] C. M. Armstrong, *J. Gen. Physiol.* **1971**, *58*, 413–437.
- [54] M. J. Lenaeus, M. Vamvouka, P. J. Focia, A. Gross, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2005**, *12*, 454–459.
- [55] M. Banghart, K. Borges, E. Isacoff, D. Trauner, R. H. Kramer, *Nat. Neurosci.* **2004**, *7*, 1381–1386.
- [56] a) R. O. Blaustein, *J. Gen. Physiol.* **2002**, *120*, 203–216; b) R. O. Blaustein, P. A. Cole, C. Williams, C. Miller, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2000**, *7*, 309–311.
- [57] J. J. Chambers, M. R. Banghart, D. Trauner, R. H. Kramer, *J. Neurophysiol.* **2006**, *96*, 2792–2796.
- [58] D. L. Fortin, T. W. Dunn, A. Fedorchak, D. Allen, R. Montpetit, M. R. Banghart, D. Trauner, J. P. Adelman, R. H. Kramer, *J. Neurophysiol.* **2011**, *106*, 488–496.
- [59] a) M. R. Banghart, A. Mourot, D. L. Fortin, J. Z. Yao, R. H. Kramer, D. Trauner, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 9261–9265; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 9097–9101; b) D. L. Fortin, M. R. Banghart, T. W. Dunn, K. Borges, D. A. Wagenaar, Q. Gaudry, M. H. Karakossian, T. S. Otis, W. B. Kristan, D. Trauner, R. H. Kramer, *Nat. Methods* **2008**, *5*, 331–338.
- [60] R. W. Gereau, G. T. Swanson, *The Glutamate Receptors*, Humana Press, New York, **2008**.
- [61] a) G. N. Barnes, J. T. Slevin, *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 2059–2072; b) M. R. Farlow, *Geriatrics* **2004**, *59*, 22–27.
- [62] S. F. Traynelis, L. P. Wollmuth, C. J. McBain, F. S. Menniti, K. M. Vance, K. K. Ogden, K. B. Hansen, H. Yuan, S. J. Myers, R. Dingledine, *Pharmacol. Rev.* **2010**, *62*, 405–496.
- [63] M. L. Mayer, *Neuron* **2005**, *45*, 539–552.
- [64] a) G. L. Collingridge, J. T. Isaac, Y. T. Wang, *Nat. Rev. Neurosci.* **2004**, *5*, 952–962; b) C. G. Lau, R. S. Zukin, *Nat. Rev. Neurosci.* **2007**, *8*, 413–426.
- [65] P. Stawski, H. Janovjak, D. Trauner, *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 7759–7772.
- [66] M. Volgraf, P. Gorostiza, R. Numano, R. H. Kramer, E. Y. Isacoff, D. Trauner, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 47–52.
- [67] M. H. Nanao, T. Green, Y. Stern-Bach, S. F. Heinemann, S. Choe, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 1708–1713.
- [68] S. Szobota, P. Gorostiza, F. Del Bene, C. Wyart, D. L. Fortin, K. D. Kolstad, O. Tulyathan, M. Volgraf, R. Numano, H. L. Aaron, E. K. Scott, R. H. Kramer, J. Flannery, H. Baier, D. Trauner, E. Y. Isacoff, *Neuron* **2007**, *54*, 535–545.
- [69] R. Numano, S. Szobota, A. Y. Lau, P. Gorostiza, M. Volgraf, B. Roux, D. Trauner, E. Y. Isacoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 6814–6819.
- [70] H. Janovjak, S. Szobota, C. Wyart, D. Trauner, E. Y. Isacoff, *Nat. Neurosci.* **2010**, *13*, 1027–1032.
- [71] G. Q. Chen, C. Cui, M. L. Mayer, E. Gouaux, *Nature* **1999**, *402*, 817–821.
- [72] C. Wyart, F. Del Bene, E. Warp, E. K. Scott, D. Trauner, H. Baier, E. Y. Isacoff, *Nature* **2009**, *461*, 407–410.
- [73] M. Volgraf, P. Gorostiza, S. Szobota, M. R. Helix, E. Y. Isacoff, D. Trauner, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 260–261.
- [74] Z. R. Abrams, A. Warrier, D. Trauner, X. Zhang, *Front Neural Circuits* **2010**, *4*, 13.
- [75] M. O. Ortells, G. G. Lunt, *Trends Neurosci.* **1995**, *18*, 121–127.
- [76] a) J. Bormann, A. Feigenspan, *Trends Neurosci.* **1995**, *18*, 515–519; b) U. Rudolph, H. Mohler, *Annu. Rev. Pharm. Toxicol.* **2004**, *44*, 475–498; c) W. Sieghart, G. Sperk, *Curr. Top. Med. Chem.* **2002**, *2*, 795–816.
- [77] a) C. M. Becker, *Neuroscientist* **1995**, *1*, 130–141; b) E. Y. Kim, N. Schrader, B. Smolinsky, C. Bedet, C. Vannier, G. Schwarz, H. Schindelin, *EMBO J.* **2006**, *25*, 1385–1395.
- [78] a) P. J. Corringer, N. Le Novere, J. P. Changeux, *Annu. Rev. Pharm. Toxicol.* **2000**, *40*, 431–458; b) A. Karlin, *Nat. Rev. Neurosci.* **2002**, *3*, 102–114.
- [79] D. Paterson, A. Nordberg, *Prog. Neurobiol.* **2000**, *61*, 75–111.
- [80] N. Unwin, *FEBS Lett.* **2003**, *555*, 91–95.
- [81] a) Y. Bourne, T. T. Talley, S. B. Hansen, P. Taylor, P. Marchot, *EMBO J.* **2005**, *24*, 1512–1522; b) K. Brejc, W. J. van Dijk, R. V. Klaassen, M. Schuurmans, J. van Der Oost, A. B. Smit, T. K. Sixma, *Nature* **2001**, *411*, 269–276; c) P. H. Celie, S. E. van Rossum-Fikkert, W. J. van Dijk, K. Brejc, A. B. Smit, T. K. Sixma, *Neuron* **2004**, *41*, 907–914; d) S. B. Hansen, G. Sulzenbacher, T. Huxford, P. Marchot, P. Taylor, Y. Bourne, *EMBO J.* **2005**, *24*, 3635–3646.
- [82] M. Brams, A. Pandya, D. Kuzmin, R. van Elk, L. Krijnen, J. L. Yakel, V. Tsetlin, A. B. Smit, C. Ulens, *PLoS Biol.* **2011**, *9*, e1001034.
- [83] E. Bartels, N. H. Wassermann, B. F. Erlanger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1971**, *68*, 1820–1823.
- [84] H. A. Lester, H. W. Chang, *Nature* **1977**, *266*, 373–374.

- [85] a) L. D. Chabala, H. A. Lester, *J. Physiol.* **1986**, *379*, 83–108; b) H. A. Lester, M. E. Krouse, M. M. Nass, N. H. Wassermann, B. F. Erlanger, *J. Gen. Physiol.* **1980**, *75*, 207–232.
- [86] J. Payandeh, T. Scheuer, N. Zheng, W. A. Catterall, *Nature* **2011**, *465*, 353–358.
- [87] C. B. Felder, R. C. Graul, A. Y. Lee, H.-P. Merkle, W. Sadee, *AAPS PharmSci* **1999**, *1*, 7–26.
- [88] E. Michard, P. T. Lima, F. Borges, A. C. Silva, M. T. Portes, J. E. Carvalho, M. Gilliam, L. H. Liu, G. Obermeyer, J. A. Feijo, *Science* **2011**, *332*, 434–437.
- [89] H. Janovjak, G. Sandoz, E. Y. Isacoff, *Nat. Commun.* **2011**, *2*, 232.
- [90] H. Brauner-Osborne, P. Wellendorph, A. A. Jensen, *Curr. Drug Targets* **2007**, *8*, 169–184.
- [91] J. P. Pin, J. Kniazeff, V. Binet, J. Liu, D. Maurel, T. Galvez, B. Duthey, M. Havlickova, J. Blahos, L. Prezeau, P. Rondard, *Biochem. Pharmacol.* **2004**, *68*, 1565–1572.
- [92] a) M. Behrens, W. Meyerhof, C. Hellfritsch, T. Hofmann, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 2268–2291; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 2220–2242; b) G. Q. Zhao, Y. Zhang, M. A. Hoon, J. Chandrashekhar, I. Erlenbach, N. J. Ryba, C. S. Zuker, *Cell* **2003**, *115*, 255–266.
- [93] T. Muto, D. Tsuchiya, K. Morikawa, H. Jingami, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 3759–3764.
- [94] X. L. He, A. Dukkipati, K. C. Garcia, *J. Mol. Biol.* **2006**, *361*, 698–714.
- [95] J. Vicogne, J. P. Pin, V. Lardans, M. Capron, C. Noel, C. Dissous, *Mol. Biochem. Parasitol.* **2003**, *126*, 51–62.
- [96] V. Cherezov, D. M. Rosenbaum, M. A. Hanson, S. G. Rasmussen, F. S. Thian, T. S. Kobilka, H. J. Choi, P. Kuhn, W. I. Weis, B. K. Kobilka, R. C. Stevens, *Science* **2007**, *318*, 1258–1265.
- [97] B. S. Khakh, *Nat. Rev. Neurosci.* **2001**, *2*, 165–174.
- [98] Y. Yu, Z. Chen, W. G. Li, H. Cao, E. G. Feng, F. Yu, H. Liu, H. Jiang, T. L. Xu, *Neuron* **2010**, *68*, 61–72.
- [99] a) E. B. Gonzales, T. Kawate, E. Gouaux, *Nature* **2009**, *460*, 599–604; b) J. Jasti, H. Furukawa, E. B. Gonzales, E. Gouaux, *Nature* **2007**, *449*, 316–323.
- [100] L. Schild, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **2010**, *1802*, 1159–1165.
- [101] A. I. Basbaum, D. M. Bautista, G. Scherrer, D. Julius, *Cell* **2009**, *139*, 267–284.
- [102] M. J. Caterina, M. A. Schumacher, M. Tominaga, T. A. Rosen, J. D. Levine, D. Julius, *Nature* **1997**, *389*, 816–824.
- [103] A. P. Christensen, D. P. Corey, *Nat. Rev. Neurosci.* **2007**, *8*, 510–521.
- [104] A. Kocer, M. Walko, W. Meijberg, B. L. Feringa, *Science* **2005**, *309*, 755–758.
- [105] G. Chang, R. H. Spencer, A. T. Lee, M. T. Barclay, D. C. Rees, *Science* **1998**, *282*, 2220–2226.
- [106] a) K. Yoshimura, A. Batiza, C. Kung, *Biophys. J.* **2001**, *80*, 2198–2206; b) K. Yoshimura, A. Batiza, M. Schroeder, P. Blount, C. Kung, *Biophys. J.* **1999**, *77*, 1960–1972.
- [107] J. H. Folgering, J. M. Kuiper, A. H. de Vries, J. B. Engberts, B. Poolman, *Langmuir* **2004**, *20*, 6985–6987.
- [108] A. A. Beharry, L. Wong, V. Tropepe, G. A. Woolley, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 1361–1363; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 1325–1327.
- [109] J. A. Ihalainen, B. Paoli, S. Muff, E. H. Backus, J. Bredenbeck, G. A. Woolley, A. Caflisch, P. Hamm, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 9588–9593.
- [110] F. Bonardi, G. London, N. Nouwen, B. L. Feringa, A. J. Driesen, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 7392–7396; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 7234–7238.
- [111] a) B. N. Armbruster, X. Li, M. H. Pausch, S. Herlitze, B. L. Roth, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 5163–5168; b) B. R. Conklin, E. C. Hsiao, S. Claeysen, A. Dumuis, S. Srinivasan, J. R. Forsayeth, J. M. Guettier, W. C. Chang, Y. Pei, K. D. McCarthy, R. A. Nissenson, J. Wess, J. Bockaert, B. L. Roth, *Nat. Methods* **2008**, *5*, 673–678.
- [112] S. Wang, S. Szobota, Y. Wang, M. Volgraf, Z. Liu, C. Sun, D. Trauner, E. Y. Isacoff, X. Zhang, *Nano Lett.* **2007**, *7*, 3859–3863.
- [113] a) K. Deisseroth, G. Feng, A. K. Majewska, G. Miesenbock, A. Ting, M. J. Schnitzer, *J. Neurosci.* **2006**, *26*, 10380–10386; b) B. A. Wilt, L. D. Burns, E. T. Wei Ho, K. K. Ghosh, E. A. Mukamel, M. J. Schnitzer, *Annu. Rev. Neurosci.* **2009**, *32*, 435–506.
- [114] N. Caporale, K. D. Kolstad, T. Lee, I. Tochitsky, D. Dalkara, D. Trauner, R. H. Kramer, Y. Dan, E. Y. Isacoff, J. C. Flannery, *Mol. Ther.* **2011**, *19*, 1212–1219.
- [115] C. J. Magnus, P. H. Lee, D. Atasoy, H. H. Su, L. L. Looger, S. M. Sternson, *Science* **2011**, *333*, 1292–1296.