

Eine Phytochrom-Sensordomäne ermöglicht eine Rezeptoraktivierung durch rotes Licht

Eva Reichhart, Alvaro Ingles-Prieto, Alexandra-Madelaine Tichy, Catherine McKenzie und Harald Janovjak*

Abstract: Optogenetik und Photopharmakologie ermöglichen eine lichtgesteuerte räumliche und zeitliche Manipulation von Prozessen in Zellen und in Tiermodellen. Obwohl rotes Licht durch minimale Toxizität und gute Gewebedurchdringung überzeugt, sind nur wenige für rotes Licht empfindliche optogenetische Hilfsmittel bekannt. Wir haben eine neue, durch rotes Licht aktivierte Homodimerisierungsdomäne in Form der Sensordomäne des cyanobakteriellen Phytochroms 1 entwickelt, die robust und ohne Zytotoxizität in menschlichen Zellen exprimiert werden kann. Mithilfe dieser Domäne induzierten wir die Dimerisierung und Aktivierung von zwei Rezeptor-Tyrosinkinasen, dem Fibroblasten-Wachstumsfaktor Rezeptor 1 und dem Neurotrophinrezeptor *trkB*. Auf diese Weise waren wir in der Lage, den MAPK/ERK-Signalweg durch Gewebe hindurch zu aktivieren und mehrfarbige Signaltransduktionsexperimente durchzuführen. Die Homodimerisierung von Proteinen und die Aktivierung von Rezeptor-Tyrosinkinasen auf Basis von rotem Licht sind vielseitige Erweiterungen des optogenetischen Repertoires.

Optogenetische Methoden sind in vielen Forschungsbereichen, vor allem in den Neurowissenschaften und der Zellbiologie, unverzichtbar geworden, da sie durch einfache optische Impulse die Steuerung und Dekodierung molekularer Netzwerke ermöglichen. Oftmals wird die Manipulation durch Änderung des intra- oder intermolekularen Bindungsstatus von Proteinen erzielt,^[1] wie es z. B. bei der lichtaktivierten GTPase Rac1 der Fall ist.^[2] Bei diesem Protein führt Licht zu einer Dissoziation der C-terminalen Helix von der LOV-Domäne (LOV = Light-Oxygen-Voltage), wodurch die Inhibierung des Enzyms aufgehoben wird. Ein weiteres Beispiel sind Cryptochrome, die im Unterschied zu manchen LOV-Domänen nicht homodimerisieren, sondern mit anderen Faktoren heterodimerisieren, um so funktionale Komplexe zu bilden.^[3] Flavinmoleküle (Flavin-Mononukleotid oder Flavin-Adenin-Dinukleotid), die als Cofaktoren in diesen Photorezeptoren agieren, sind verantwortlich für die Absorption von blauem Licht (Abbildung 1 a). Blaues Licht aktiviert jedoch auch viele häufig verwendete Fluorophore und kann Gewebe nur minimal durchdringen, was die An-

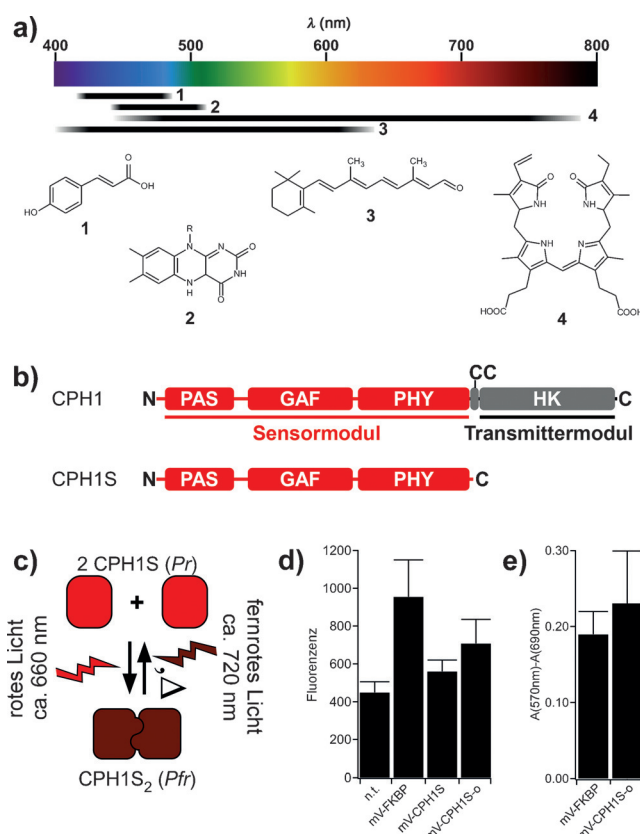


Abbildung 1. a) Chromophore der wichtigsten Photorezeptorklassen (1: *p*-Cumarsäure, 2: Flavine, 3: Retinal, 4: Tetrapyrrole). b) Domänenstruktur von CPH1 mit Sensordomäne (CPH1S) und Transmittermodul (PAS: PerArntSim; GAF: cGMP-spezifische Phosphodiesterase, Adenylcyclase und FhlA; PHY: Phytochrom; HK: Histidinkinase). c) CPH1S wechselt zwischen dem hauptsächlich monomeren Pr- und dem vorwiegend homodimeren Pfr-Zustand. d) Fluoreszenzintensität von mVenus(mV)-CPH1S, -CPH1S-o und -FKBP in HEK293-Zellen; n.t.: nicht transfizierte Zellen. e) Viabilität von HEK293-Zellen, transfiziert mit mV-FKBP oder mV-CPH1S-o. d), e) Mittelwert \pm Standardabweichung für drei unabhängige, in Triplikaten ausgeführte Experimente.

wendungsmöglichkeiten einschränkt. Obwohl dies auf rotes Licht nicht zutrifft, ist die Aktivierung durch rotes Licht bisher auf Proteine beschränkt, die heterodimerisieren oder cyclische (Di-)Nukleotide umsetzen.^[4] Hier beschreiben wir eine Umfunktionierung des cyanobakteriellen Phytochroms 1 (CPH1) aus *Synechocystis*, das durch rotes Licht homodimerisiert. Wir verwendeten CPH1, um Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs) in Säugetiergewebe und unabhängig von fluoreszierenden Proteinen mit rotem Licht zu aktivieren.

*] E. Reichhart, Dr. A. Ingles-Prieto, A.-M. Tichy, C. McKenzie, Dr. H. Janovjak
Synthetic Physiology, Institute of Science and Technology Austria (IST Austria)
Am Campus 1, 3400 Klosterneuburg (Österreich)
E-Mail: harald@ist.ac.at

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind unter:
<http://dx.doi.org/10.1002/ange.201601736> zu finden.

Phytochrome bilden eine große Proteinfamilie in Mikroben und Pflanzen, die durch Bindung linearer Tetrapyrrole Licht absorbieren kann (Abbildung 1a).^[5] Manche dieser Phytochrome können zwischen zwei Zuständen wechseln – im Fall von CPH1 einem hellrot absorbierenden Pr- und einem dunkelrot absorbierenden Pfr-Zustand. Bei In-vitro-Experimenten wurde gezeigt, dass die Sensordomäne von CPH1 (CPH1S; Abbildung 1b) nach Lichtabsorption ihren Oligomerisierungszustand ändert.^[6] Hellrotes Licht resultiert im homodimeren Pfr- und dunkelrotes Licht im monomeren Pr-Zustand (Abbildung 1c). Daraus folgte unsere Hypothese, dass CPH1S dazu verwendet werden kann, Protein-Protein-Wechselwirkungen mithilfe von rotem Licht zu steuern. Da CPH1S bisher nie in Säugetierzellen exprimiert wurde, testeten wir zuerst in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293), ob CPH1S mit der Proteinproduktion harmoniert. Für die Quantifizierung kombinierten wir das 1539 Basenpaare lange CPH1S-Fragment mit dem gelb fluoreszierenden Protein mVenus. HEK293-Zellen, die mit diesem Konstrukt (Abbildung 1d) transfiziert wurden, zeigten nur schwache Fluoreszenz, was auf geringe Proteinexpression schließen ließ. Als Ursache vermuteten wir den nicht übereinstimmenden Codongebrauch zwischen dem cyanobakteriellen Gen und den menschlichen Zellen.^[7] Eine Codon-optimierte Variante des Gens (CPH1S-o) resultierte in erhöhter Fluoreszenz ohne messbare zytotoxische Effekte (Abbildung 1d,e).

Homodimerisierung liegt der Funktionsweise von vielen Proteinfamilien wie Kinasen, Cadherinen, Antikörpern, Motorproteinen oder Transkriptionsfaktoren zugrunde. So wurde kürzlich gezeigt, dass für viele RTKs Homodimerisierung ausreichend ist, um eine Aktivierung der intrazellulären Signalwege zu erzielen. Beispiele hierfür sind der MAPK/ERK-Signalweg (MAPK/ERK = mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase) oder der PI3K/Akt-Signalweg (PI3K = Phosphatidylinositol-3-Kinase).^[8] Um eine durch rotes Licht aktivierte RTK zu erzeugen, kombinierten wir CPH1S-o mit dem C-Terminus von mFGFR1 (muriner Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor 1; Abbildung 2a). Am C-Terminus dieses Rezeptors wurden bereits fluoreszierende Proteine und chemische Homodimerisierungsdomänen, etwa das FK506 Binding Protein (FKBP), integriert.^[9] Die extrazelluläre Domäne des Rezeptors wurde durch einen Myristoilierungsrest ersetzt, um eine Aktivierung durch natürliche Liganden auszuschließen.^[9a,10] Als nächstes untersuchten wir, ob mFGFR1-CPH1S-o und der MAPK/ERK-Signalweg durch rotes Licht in HEK293-Zellen aktiviert werden können. Wir stellten fest, dass Zellen, deren Medium mit dem Tetrapyrrol Phycocyanobillin (PCB) ergänzt wurde, auf rotes Licht ($I = 6.2 \mu\text{W cm}^{-2}$, $\lambda \approx (630 \pm 5) \text{ nm}$) mit starker Signalwegaktivierung reagierten (Abbildung 2b). Kontrollexperimente hingegen zeigten, dass 1) blaues ($I = 150 \mu\text{W cm}^{-2}$, $\lambda \approx (470 \pm 5) \text{ nm}$) oder grünes Licht ($I = 6.2 \mu\text{W cm}^{-2}$, $\lambda \approx (530 \pm 5) \text{ nm}$) den Signalweg nicht aktivierten und 2) rotes Licht keinen Effekt nach Verlust der Kinaseaktivität (Y271F- und Y272F-Mutationen) sowie auf mFGFR1-FKBP-Fusionsproteine hatte (Abbildung 2b). Zu erwähnen ist, dass die Resultate von mFGFR-FKBP darauf schließen lassen, dass mFGFR1-CPH1S-o im Dunkeln kaum

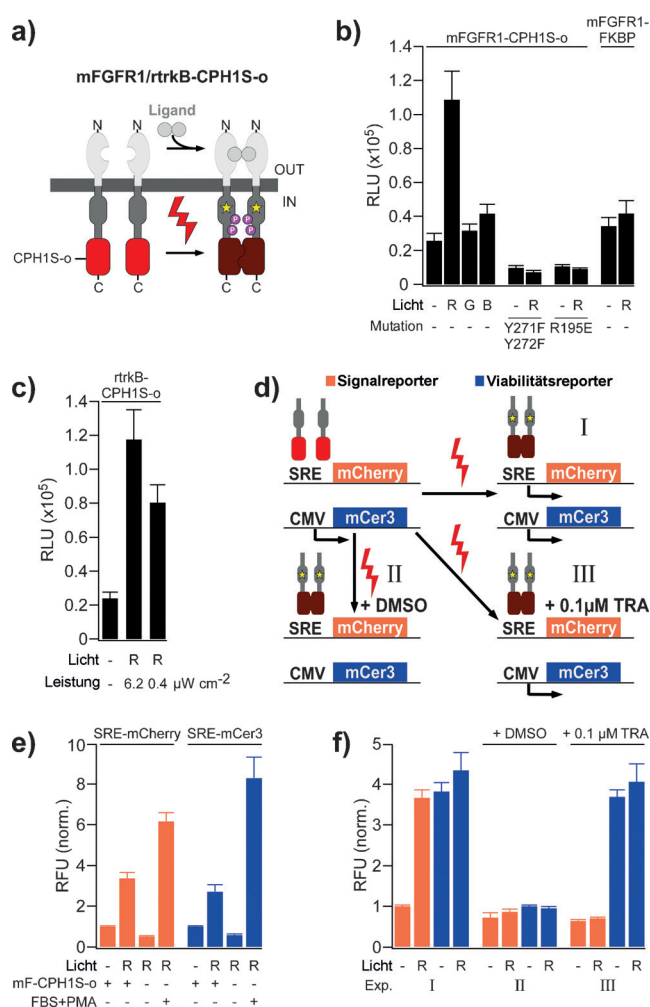


Abbildung 2. a) CPH1S-o (rot) wurde in mFGFR1 oder rtrkB eingefügt, um durch rotes Licht aktivierte Rezeptoren zu erzeugen. b), c) MAPK/ERK-Signalwegaktivierung durch mFGFR1-CPH1S-o (b) und rtrkB-CPH1S-o (c) nach Beleuchtung mit rotem (R), grünem (G) oder blauem Licht (B). Signalwegaktivierung in HEK293-Zellen. d) Mehrfarbige Experimente, um die Rezeptor/Signalweg-Inhibition und Zellviabilität zu testen. I) CMV-mCerulean3 wird konstitutiv exprimiert, während SRE-mCherry dem MAPK/ERK-Signalweg unterliegt (mCerulean3: mCerulean3). II) Zugabe von DMSO führt zum Zelltod und somit weder zur Expression von mCherry noch zu der von mCerulean3. III) Zugabe von 0.1 μM Trametinib (TRA) verhindert MAPK/ERK-Signalwegaktivierung; Zellviabilität wird nicht beeinflusst. IV) MAPK/ERK-Signalwegaktivierung durch mFGFR1-CPH1S-o nach Beleuchtung mit rotem Licht, gemessen mit SRE-mCherry/-mCerulean3. FBS+PMA fungierte als Positivkontrolle. e) Experimentelle Umsetzung von (d). MAPK/ERK-Signalwegaktivierung von mit DMSO oder TRA behandelten Zellen nach Beleuchtung mit rotem Licht. Signalwegaktivierung und Zellviabilität jeweils als mCherry- oder mCerulean3-Fluoreszenzintensität. b), c) Mittelwert \pm Standardfehler für 2–17 unabhängige, in Triplikaten ausgeführte Experimente. e), f) Mittelwert \pm Standardfehler für drei unabhängige, in Triplikaten ausgeführte Experimente.

als Dimer vorliegt. Durch Substitution eines konservierten Argininrestes (R195) mit einem Glutamat in der katalytischen Domäne von mFGFR1, was die Bildung eines essenziellen, asymmetrischen Kinasedomänen-Dimers verhindert,^[11] konnten wir außerdem zeigen, dass Dimerisierung für

die Rezeptoraktivierung durch CPH1S-o nötig ist (Abbildung 2b).

Wir wendeten dasselbe Prinzip auf den Neurotrophin-Rezeptor *trkB* der Ratte (*trkB*) an. Auch in diesem Fall resultierte rotes Licht in PCB-abhängiger Signalwegaktivierung (Abbildungen 2c und S1 (Hintergrundinformationen)). Immunblots zeigten, dass die Aktivierung des MAPK/ERK- und PI3K/Akt-Signalwegs ca. 30 min nach Beleuchtung wieder den Anfangswerten entsprach (Abbildung S2). Zudem führte rotes Licht nur im Fall von CPH1S-o, jedoch nicht bei anderen cyano- oder proteobakteriellen Phytochromen (Abbildung S3), zu einer Aktivierung.

CPH1 und andere Phytochrome absorbieren rotes Licht, die meisten fluoreszierenden Proteine hingegen Licht von kürzerer Wellenlänge (die typischen blau, grün und rot fluoreszierenden Proteine werden bei $\lambda \approx 440, 490$ bzw. 560 nm angeregt). In einigen Studien wurden Phytochrome deshalb als Fluorophore für mehrfarbiges Imaging genutzt.^[12] Ausgehend davon untersuchten wir, ob CPH1S-o und zwei fluoreszierende Proteine in einem Experiment kombiniert werden können; bei den Proteinen handelte es sich um mCerulean3 mit $\lambda(E_x/E_m) = 433/475$ nm sowie mCherry mit $\lambda(E_x/E_m) = 587/610$ nm.^[13] Ziel dieser Experimente war, Zellen sowohl optisch zu aktivieren (CPH1S-o) als auch eine Signalwegaktivierung und Viabilität mit zwei fluoreszierenden Proteinen gleichzeitig festzustellen (Abbildung 2d). Dafür entwickelten wir zuerst fluoreszierende Reportergene für den MAPK/ERK-Signalweg, bei dem mCerulean3 und mCherry der Kontrolle des Serum-Response-Element(SRE)-Promotors unterlagen.^[14] Als nächstes testeten wir, ob rotes Licht, das für die Aktivierung von CPH1S-o benötigt wird, diese Proteine in ungewünschter Weise beeinflusst. Wie erwartet konnte keine Photobleichung der fluoreszierenden Proteine nach Bestrahlung mit rotem Licht festgestellt werden (Abbildung S4), was die Detektion einer spezifischen Signalwegaktivierung durch mFGFR1-CPH1S-o ermöglicht (Abbildung 2e). Wir verwendeten nun diese Komponenten, um eine lichtinduzierte Signaltransduktion unabhängig von der Zellviabilität zu ermitteln. Als Viabilitätsreporter verwendeten wir mCerulean3 unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven Cytomegalovirus(CMV)-Promotors. Zellen wurden sowohl mit dem Viabilitätsreporter als auch dem mCherry-MAPK/ERK-Reporter transfiziert, gefolgt von Inkubation in zytotoxischem, DMSO-reichem Medium oder Medium, das mit Trametinib (TRA) angereichert war, einem Inhibitor, der spezifisch auf den MAPK/ERK-Signalweg wirkt (Abbildung 2d). TRA reduzierte das durch rotes Licht induzierte mCherry-Signal, nicht jedoch das konstitutive mCerulean3-Signal, wohingegen DMSO beide Signale reduzierte (Abbildung 2f). Diese Beobachtung belegt, dass die spektralen Eigenschaften von CPH1S-o die Unterscheidung zwischen spezifischen Signalweginhibitoren und unspezifischen Toxinen in einem einzigen, rein optischen Experiment ermöglichen. In Zukunft könnte dieses Prinzip angewendet werden, um mehrere Prozesse mit verschiedenen Wellenlängen unabhängig voneinander zu aktivieren, entweder in einer einzigen Zelle oder in verschiedenen Zelltypen einer heterogenen Population, um die Wechselwirkungen zwischen Signalwegen oder Zellen zu untersuchen.

Eines der wichtigsten Merkmale roten Lichts ist die Fähigkeit, Gewebe tiefer als blaues oder grünes Licht zu durchdringen. Experimente mit blauem Licht benötigen in Mausmodellen oft implantierte oder sehr helle Lichtquellen.^[3b,15] Aus diesem Grund testeten wir, ob CPH1S-o durch transdermale Beleuchtung aktiviert werden kann. Beleuchtung von HEK293-Zellen, die mit *trkB*-CPH1S-o transfiziert waren, durch synthetisches Muskel-, Haut- oder Schädelgewebe (Abbildung S5) resultierte in einer Signalwegaktivierung (Abbildung S6). Erwähnenswert ist, dass die verwendeten Lichtintensitäten geringer waren als bei der photodynamischen Therapie^[16] und dass gewöhnliche LEDs ausreichten, um diese zu erzeugen. Auch bei Beleuchtung von mit mFGFR1-CPH1S-o transfizierten INS-1E-Zellen mit rotem Licht ($I = 3.0 \text{ mW cm}^{-2}$, $\lambda \approx (647 \pm 35) \text{ nm}$) durch Mausabdomen (einschließlich Haut, Muskeln, Fett und Rückgrat; Dicke 10 mm; Abbildung S7) stellten wir eine Aktivierung des MAPK/ERK-Signalweges fest (Abbildung S8). Insulinoma-INS-1E-Zellen, ein Modell für pankreatische β -Zellen,^[17] wurden für dieses Experiment verwendet, da FGF in β -Zellen verschiedene Signalkaskaden aktiviert und β -Zellen in Mäusen ca. 10 mm unter der Haut liegen. Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass durch rotes Licht aktiviertes CPH1S-o auch eine Signaltransduktion in Zellen durch Gewebe hindurch anregen kann, was neue Wege für weitere, nicht-invasive In-vivo-Optogenetikstudien ebnet.

Lichtempfindliche Proteine, die reversibel ihren inter- oder intramolekularen Bindungsstatus ändern, sind die treibende Kraft vieler optogenetischer Methoden. Wir stellen hier eine Methode für die stöchiometrische, durch rotes Licht induzierbare Homodimerisierung von Proteinen durch Anwendung der cyanobakteriellen Phytochrom-Sensordomäne CPH1S vor. Dieser Ansatz wird auch Anwendung finden, um die Zelladhäsion, die Gentranskription oder das Zytoskelett zu regulieren, möglicherweise auch durch die Bildung größerer Komplexe nach Inkorporation mehrerer Photorezeptordomänen.

Danksagung

Wir danken M. Spanova und K. Kolev für technische Hilfe, R. Riedler, S. Laukoter und S. zur Nedden für Hilfe bei Vorexperimenten, P. Maechler für INS-1E-Zellen, I. Maldener für Cyanobakterien, R.Y. Tsien für mCherry und mVenus, M. Davidson für mCerulean3 und M. Grusch für Diskussionen. Diese Studie wurde unterstützt von der EU FP7 (CIG-303564). A.I.-P. wurde unterstützt von einem Ramon Areces Fellowship und E.R. vom Doktoratsprogramm Molecular-DrugTargets (Österreichischer Wissenschaftsfonds (FWF): W1232) und einer FemTech Fellowship (Österreichische Forschungsförderungsgesellschaft: 3580812).

Stichwörter: Optogenetik · Photochromie · Phytochrom · Rezeptoren

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 6339–6342
Angew. Chem. **2016**, *128*, 6447–6450

- [1] a) K. Müller, W. Weber, *Mol. Biosyst.* **2013**, *9*, 596–608; b) A. Möglich, K. Moffat, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2010**, *9*, 1286–1300.
- [2] Y. I. Wu, D. Frey, O. I. Lungu, A. Jaehrig, I. Schlichting, B. Kuhlman, K. M. Hahn, *Nature* **2009**, *461*, 104–108.
- [3] a) M. J. Kennedy, R. M. Hughes, L. A. Peteya, J. W. Schwartz, M. D. Ehlers, C. L. Tucker, *Nat. Methods* **2010**, *7*, 973–975; b) X. Wang, X. Chen, Y. Yang, *Nat. Methods* **2012**, *9*, 266–269.
- [4] a) M. H. Ryu, I. H. Kang, M. D. Nelson, T. M. Jensen, A. I. Lyuksyutova, J. Siltberg-Liberles, D. M. Raizen, M. Gomelsky, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 10167–10172; b) C. Gasser, S. Taiber, C. M. Yeh, C. H. Wittig, P. Hegemann, S. Ryu, F. Wunder, A. Möglich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 8803–8808; c) M. Folcher, S. Oesterle, K. Zwicky, T. Thekkotttil, J. Heymoz, M. Hohmann, M. Christen, M. Daoud El-Baba, P. Buchmann, M. Fussenegger, *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 5392; d) A. Levskaya, O. D. Weiner, W. A. Lim, C. A. Voigt, *Nature* **2009**, *461*, 997–1001.
- [5] N. C. Rockwell, J. C. Lagarias, *ChemPhysChem* **2010**, *11*, 1172–1180.
- [6] H. M. Strauss, P. Schmieder, J. Hughes, *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 3970–3974.
- [7] a) K. D. Wells, J. A. Foster, K. Moore, V. G. Pursel, R. J. Wall, *Transgenic Res.* **1999**, *8*, 371–381; b) P. M. Sharp, E. Cowe, D. G. Higgins, D. C. Shields, K. H. Wolfe, F. Wright, *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 8207–8211.
- [8] J. Schlessinger, *Cell* **2000**, *103*, 211–225.
- [9] a) B. E. Welm, K. W. Freeman, M. Chen, A. Contreras, D. M. Spencer, J. M. Rosen, *J. Cell Biol.* **2002**, *157*, 703–714; b) D. M. Bryant, F. G. Wylie, J. L. Stow, *Mol. Biol. Cell* **2005**, *16*, 14–23.
- [10] M. Grusch, K. Schelch, R. Riedler, E. Reichhart, C. Differ, W. Berger, A. Ingles-Prieto, H. Janovjak, *EMBO J.* **2014**, *33*, 1713–1726.
- [11] J. H. Bae, T. J. Boggon, F. Tome, V. Mandiyan, I. Lax, J. Schlessinger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 2866–2871.
- [12] a) X. Shu, A. Royant, M. Z. Lin, T. A. Aguilera, V. Lev-Ram, P. A. Steinbach, R. Y. Tsien, *Science* **2009**, *324*, 804–807; b) D. M. Shcherbakova, V. V. Verkhusha, *Nat. Methods* **2013**, *10*, 751–754.
- [13] a) M. L. Markwardt, G. J. Kremers, C. A. Kraft, K. Ray, P. J. Cranfill, K. A. Wilson, R. N. Day, R. M. Wachter, M. W. Davidson, M. A. Rizzo, *PLoS One* **2011**, *6*, e17896; b) N. C. Shaner, R. E. Campbell, P. A. Steinbach, B. N. Giepmans, A. E. Palmer, R. Y. Tsien, *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 1567–1572.
- [14] C. S. Hill, R. Treisman, *EMBO J.* **1995**, *14*, 5037–5047.
- [15] A. M. Aravanis, L. P. Wang, F. Zhang, L. A. Meltzer, M. Z. Mogri, M. B. Schneider, K. Deisseroth, *J. Neural Eng.* **2007**, *4*, S143–156.
- [16] a) J. P. Celli, B. Q. Spring, I. Rizvi, C. L. Evans, K. S. Samkoe, S. Verma, B. W. Pogue, T. Hasan, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2795–2838; b) B. C. Wilson, M. S. Patterson, *Phys. Med. Biol.* **2008**, *53*, R61–109.
- [17] A. Merglen, S. Theander, B. Rubi, G. Chaffard, C. B. Wollheim, P. Maechler, *Endocrinology* **2004**, *145*, 667–678.

Eingegangen am 18. Februar 2016

Online veröffentlicht am 21. April 2016