Genetisch kodierte optische Sensoren des neuronalen Membranpotenzials: Was sind die Perspektiven für die hochauflösende Messung elektrischer Signale in kortikalen Hirnstrukturen?

Walther Akemann und Thomas Knöpfel

Zusammenfassung

Zur Erforschung der Funktionsweise kortikaler neuronaler Schaltkreise bedarf es experimenteller Methoden, die die elektrische Aktivität sehr vieler Nervenzellen innerhalb eines gewählten Gewebebereichs simultan erfassen. Dadurch motiviert ist die Entwicklung einer optischen Technik zur Ableitung elektrischer Potenziale in Nervenzellen durch genetisch codierte Proteinindikatoren mit membranspannungsabhängiger Fluoreszenzemission (VSFPs: Voltage-Sensitive Fluorescent Proteins). Alle bisher entwickelten Proteine dieser Art sind als Fusionsproteine mit Komponenten aus spannungsgesteuerten Membranproteinen und fluoreszierenden Proteinen konzipiert. Fluoreszierende Spannungssensorenproteine mit den bisher besten Eigenschaften (VSFP2 und VSFP3) enthalten einen Teil einer spannungsgesteuerten Phosphatase der Schlauchseescheide (*ciona intestinalis*). Wir beschreiben den gegenwärtig erreichten Stand der Entwicklung dieser Proteine in Hinblick auf ihre Anwendung zur Messung der Dynamik und Ausbreitung elektrischer Erregung in kortikalen neuronalen Netzwerken in Echtzeit und mit hoher räumlich-funktioneller Auflösung.

Abstract

Genetically-encoded optical sensors of membrane voltage: perspectives for high-resolution imaging of electrical excitation in cortical brain structure.

The research on the function of neuronal cortical circuits is in need for experimental methods to monitor electrical activity of large neuronal assemblies in brain tissue. This demand motivates the development of genetically-encoded voltage-sensitive fluorescent proteins (VSFPs) for the detection of electrical potentials in nerve cells. All currently known VSFPs were developed as protein fusions between components from voltage-gated membrane proteins and fluorescent proteins. The VSFP proteins with the best performance so far (VSFP 2 and VSFP3 families) comprise a domain from a voltage-gated phosphatase of the ascidian *ciona intestinalis*. We describe the current status of development of these proteins with regard to applications in high-resolution, real-time imaging of electrical activity in large-scale networks of cortical neurons.

Keywords: VSFP; voltage-sensitive fluorescent proteins; Ci-VSP; cortical neurons; cortical networks; voltage imaging

Einleitung

Eine der fundamentalen Herausforderungen der modernen Hirnforschung besteht darin, die Vorgänge zu verstehen, mit denen Gegenstände und Ereignisse der physikalischen Wirklichkeit in den Zustandsraum elektrischer Aktivitätsmuster des zentralen Nervensystems abgebildet werden. Dabei stellt sich unter anderem die Frage, wie aus

primärer sensorischer Information kognitive Korrelate der externen Wirklichkeit entstehen und nach welchen Regeln diese codiert sind. Eine einflussreiche Hypothese geht auf Wolf Singer und seine Mitarbeiter am Max-Planck-Institut für Hirnforschung in Frankfurt/M. zurück, wonach die durch sensorische Aktivität verursachte Erregung kortikaler Populationen von Nervenzellen durch kollektive Oszillation der Membran-

spannung koordiniert wird. Die Populationsoszillationen könnten demnach dazu beitragen, den Beziehungszusammenhang ('Bindung') zwischen Elementen der im Netzwerk räumlich verteilten Information durch zeitliche Synchronisierung individuell erregter Nervenzellen herzustellen (siehe Exkurs 1). Trotz dieses und anderer interessanter Ansätze ist das heute erreichte Verständnis der dynamischen Prozesse in kortikalen Netzwerken insgesamt sehr unvollständig. So sind selbst grundlegende Mechanismen der Entstehung und räumlich-zeitlichen Struktur neuronaler Oszillationen und ihrer Wechselwirkung mit Erregungen individueller Nervenzellen nur teilweise aufgeklärt. Eine wesentliche Hemmnis für die Analyse dieser Vorgänge ist das Fehlen geeigneter experimenteller Verfahren, die es erlauben würden, die elektrische Aktivität des Gehirngewebes unter Einschluss aller miteinander kommunizierender Zelltypen, zumindest innerhalb kleiner Volumenbereiche, simultan und in Echtzeit auszuweisen.

Messung der elektrischen Erregung in kortikalen Netzwerken

Moderne bildgebende Verfahren der klinischen Hirnforschung, wie MRI (Magnetic-Resonance-Imaging, PET (Positron-Emission-Tomography) und XCT (X-ray Computer Tomography) ermöglichen eine räumliche Auflösung kortikaler Strukturen, die in etwa der Größe kolumnarer kortikaler Module entspricht (siehe Exkurs 1). Zeitaufauflösende Varianten dieser Verfahren (fMRI: funktional MRI; fPET: funktional PET) bilden die durch elektrische Erregung ausgelöste Steigerung metabolischer Aktivität in einzelnen Gehirnarealen ab, bleiben dabei aber um Größenordnungen von der räumlichen und zeitlichen Auflösung entfernt, die erforderlich wäre, um die Abfolge elektrischer Potenziale einzelner Nervenzellen des lokalen neuronalen Netzwerks zu erfassen. In der neurophysiologischen Forschung kommen daher oft andere Verfahren zum Einsatz, die eine Messung der elektrischen Erregung auf Einzelzellniveau in Tierexperimenten ermöglichen. Dazu zählen die direkte Ableitung elektrischer Potenziale durch implantierte Elektroden und bildgebende Verfahren auf der Basis intrazellulärer oder membrangebundener Fluoreszenzindikatoren (Knöpfel et al. 2006). Elektrodenableitungen erreichen eindeutig die höchste Empfindlichkeit und Zeitaufauflösung. Da implantierte Elektroden das Gehirngewebe unvermeidbar schädigen, beschränkt sich die Anwendung dieser klassischen elektrophysiologischen Methodik

Exkurs 1

Struktur und Funktion kortikaler neuronaler Schaltkreise

Die Grosshirnrinde der Säugetiere hat eine durchgehende laminare Struktur, die aus sechs zytologisch deutlich unterscheidbaren Lagen besteht. Die laterale Variation der Zytoarchitektur gibt Anlass zu der Unterteilung in kortikale Areale (nach Brodmann; 50 plus Unterteilungen beim Menschen) die in den meisten Fällen auch eine klare funktionale Spezialisierung zeigen. Innerhalb der sensorischer Areale (z.B. somatosensorisch, visuell, auditorisch) lassen sich elementare Funktionseinheiten, sogenannte kolumnare Module, anhand minimal unterscheidbarer sensorischer Rezeptionsfelder definieren. Der horizontale Durchmesser dieser Module wird oft mit etwa 500 μm abgeschätzt. Unter der Annahme, dass sich kolumnaren Einheiten dieser Grösse mosaikartig über die gesamte Grosshirnrinde fortsetzen, ergibt sich beim Menschen eine Gesamtanzahl von etwa 2 Millionen Module mit zwischen 20.000 bis 70.000 Neuronen pro Modul. Jede dieser Einheiten besteht aus einem Netzwerk erregender Zelltypen (Pyramidalzellen; $\sim 70\%$) und hemmender Interneurone (u.a. Sternzellen, Korbzellen, Spindelzellen), wobei die verschiedenen Segmente der Pyramidalzellen (Zellkörper, Dendriten, Axone) typischerweise von verschiedenen Interneuron-Klassen innerviert sind. Die lokalen neuronalen Schaltkreise setzen sich aus dem System der einzelnen Zellen und ihren lokalen synaptischen Verbindungen (im Gegensatz zu den langreichweitigen Verbindungen aus z.B. Assoziations- und Kommissurenfasern) zusammen. Eine wichtige Eigenschaft der lokalen kortikalen Schaltkreise besteht darin, synchronisierte rhythmische Modulationen des Membranpotenzials in spezifischen Zellgruppen auszulösen. Diese kollektiven Oszillationen fördern die Synchronisation von Aktionspotenzialen innerhalb dieser Zellgruppen und kodieren synaptische Informationen in Phasenbeziehungen um. Zur Erforschung dieser im Detail aber unverständlichen Mechanismen bedarf es experimenteller Methoden, die die elektrische Aktivität sehr vieler Nervenzellen innerhalb eines lokalen kortikalen Schaltkreises simultan erfassbar machen.

auf die Registrierung einer relativ geringen Anzahl von Neuronen in einem gegebenen Volumenbereich. Es ist daher zweifelhaft, ob mit Mikroelektroden-Techniken zum Beispiel die Funktion und interne Dynamik kortikaler Kolumnen (Module) hinreichend genau erfasst werden kann. Optische Methoden hingegen ermöglichen es im Prinzip, die Aktivität beliebig vieler Nervenzellen ohne Gewebeverletzung innerhalb eines gewählten Gewebeausschnitts simultan zu erfassen. Empfindlichkeit und Auflösungsvermögen optischer Verfahren wird grundsätzlich bestimmt durch das Antwortverhalten des verwendeten Indikatorfarbstoffs, dessen Verteilung im Gewebe und von den optischen Bedingungen zur Registrierung der Indikatorsignale. In der Anwendung gegenwärtig am weitesten verbreitet sind kalziumsensitive Fluoreszenzindikatoren. Diese reagieren auf transiente Erhöhungen der intrazellulären Kalziumionenkonzentration wie sie typischerweise von Aktionspotenzialen in Nervenzellen ausgelöst werden. Wie Werner Göbel und Fritjof Helmchen vom Institut für Hirnforschung der Universität Zürich zeigen konnten, lassen sich durch Verwendung von Kalziumindikatoren in Kombination mit schnellen Laser-Raster-Verfahren neuronale Aktivitätsmuster 3-dimensional verteilter Zellpopulationen der Hirnrinde im lebenden Tier in Echtzeit auslesen (Göbel und Helmchen 2008). Es gibt allerdings auch Fragestellungen, die sich wohl nur mit einer direkten Messung der schnellen elektrischen Membrantvorgänge beantworten lassen werden. Dazu gehört unter anderem die einführend erwähnte Frage der räumlich-zeitlichen Organisation koordinierter neuronaler Aktivität unter dem Einfluss schneller Oszillationen des kortikalen Netzwerks, siehe (Exkurs 1).

Optisch-potenzimetrische Messung neuronaler elektrischer Erregung

Für die direkte optische Messung der Membranspannung sind seit vielen Jahren potenzimetrische Fluoreszenzindikatoren verfügbar, die den Zeitverlauf einzelner Aktionspotenziale auflösen. Die technischen Anforderungen an Messungen mit potenzimetrischen Farbstoffen sind allerdings sehr hoch und die Interpretation von Signalen aus intaktem Hirngewebe ist meist begrenzt. Die heute verfügbaren Fluoreszenzfarbstoffe zeigen bestenfalls 20 % Fluoreszenzänderung bei 100 mV Membranspannungsänderung. Die Basisfluoreszenz im Ruhezustand der Zelle, d.h. in der Nähe des Ruhepotenzials (~ -70 mV) ist damit also deutlich höher als die maximal zu erwartenden Fluoreszenzän-

derungen durch elektrische Erregung. Unter praktischen Bedingungen ist die Grundfluoreszenz noch um ein Vielfaches erhöht, da typischerweise auch elektrisch inaktive Membranen mit dem Indikator eingefärbt sind, was zu einer weiteren erheblichen Verminderung der messbaren Fluoreszenzänderungen führt. Weitere messtechnische Schwierigkeiten ergeben sich aus der geringen Zahl detektierbarer Fluoreszenzphotonen pro Messintervall bedingt durch die zur Messung schneller elektrischer Transienten notwendigen hohen Akquisitionsraten. Dieser Faktor erhöht den Rauschanteil im emittierten Fluoreszenzsignal. In der Praxis zeigt sich daher, dass Messungen auf der Basis konventioneller potenzimetrischer Farbstoffe durch ungünstige Signal/Rauschverhältnisse gekennzeichnet sind.

Wegen des potenziell großen Nutzens potenzimetrischer Messungen für die neurophysiologische Forschung sind Verbesserungen dieser Messtechnik von großer Bedeutung. Eine aussichtsreiche Weiterentwicklung, zu der wir maßgeblich beitragen haben, besteht aus der Entwicklung künstlicher Membranproteine mit spannungsabhängigen Fluoreszenzeigenschaften. Potenzialmetrische Indikatoren auf der Basis von Proteinen lassen sich durch Gentransfer in definierte Zellpopulationen einschleusen. Die genetische Kontrolle der Lokalisierung des Indikators im Gewebe bringt eine enorme Verbesserung des Messverfahrens in der physiologischen Anwendung mit sich: Zum einen werden parasitäre Beiträge zur Grundfluoreszenz durch unselektiv eingefärbte Membranen (z.B. Gliazellen) vermieden ausserdem ergibt sich ein wesentlicher Vorteil bei der Signalinterpretation durch die strikte Zuordnung eines gemessenen Spannungssignals zu Zellen definierten Genotyps. So lassen sich zum Beispiel kollektive elektrische Erregungen in genetisch definierten Zellpopulation untersuchen und zwar unabhängig von der räumlichen Auflösung der optischen Messung. Durch Entwicklung von Indikatoren mit hinreichend unterschiedlichen Emissionsspektren ist es ferner denkbar, Signale definierter Subpopulationen nach spektralen Kanälen getrennt simultan auszulesen.

Natürliche Membranproteine mit spannungsabhängiger Funktion

Die Entwicklung künstlicher Membranproteine mit spannungsabhängiger Fluoreszenz, abgekürzt VSFPs (voltage-sensitive fluorescent proteins), wurde ermöglicht durch Klonierung und funktioneller Charakterisierung natürlich vorkommender

spannungsgesteuerter Membranproteine. Zu diesen gehören die Gruppe der spannungsgesteuerten Ionenkanäle mit den Familien der Kalium- (Kv), Natrium- (Nav) und Kalziumkanäle (Cav). Vor Kurzem wurden außerdem als weitere Gruppen spannungsgesteuerte Protonenkanäle (Hv) und spannungsgesteuerte Phosphatasen (VSP; voltage-sensor containing phosphatase) beschrieben (Abbildung 1A). Es ist bemerkenswert, dass allen bisher bekannten Proteinen mit ausgeprägter spannungsabhängiger Funktion ein weitreichend homologer Bauplan zugrunde liegt. So setzen sich Kv-Kanäle aus vier Kv-Protomeren zusammen, die aus jeweils sechs helikalen Membransegmenten (S1 bis S6) bestehen, die durch intra- und extrazelluläre Schleifen verbunden sind (Abbildung 1A). Die tetramere Anordnung der Segmente S5 und S6 (zusammen mit der kurzen P-Helix zwischen S5 und S6) ergibt die Membranpore, d.h. den eigentlichen Ionenkanal, einschließlich des Selektivitätsfilters und der Elemente zur Regelung der Kanalleitfähigkeit. Die Segmente S1 bis S4 bilden den eigentlichen Spannungssensor (VSD; voltage sensor domain), wobei in der 3-dimensionalen Struktur des Kv-Kanals die vier Spannungssensoren außerhalb der zentralen Membranpore am äußeren Rand des tetrameren Proteinkomplexes angeordnet sind. Eukaryotische Nav-Kanäle werden von einem einzigen Protein mit vier homologen Domänen (I bis IV) gebildet, die in ihrer sekundären Struktur jeweils den protomeren Einheiten der Kv-Kanäle entsprechen. Spannungsgegesteuerte Phosphatasen bestehen wiederum aus einem

Abb. 1: Struktur und Funktion spannungsgesteuerter Membranproteine. (A) Schematische Sekundärstruktur aus transmembranen Segmenten (numeriert von S1 bis S6) des spannungsgesteuerten Kaliumkanals Kv1, der spannungsabhängigen Phosphatase VSP und des spannungsgesteuerten Protonenkanals Hv1 (von oben nach unten). Aus den Strukturelementen von S5 bis S6 (Porendomäne) in Kv1 wird durch Tetramerisierung mit anderen Kv1-Einheiten der eigentliche Ionenkanal gebildet. Die Struktur von S1 bis S4 ist der eigentliche Spannungssensor (VSD). In VSP steuert der Spannungssensor die Aktivität einer Phosphatase (Phosphoinositide 3-Kinase). In Hv1 ist der Protonen-Permeationsweg Teil des Spannungssensors. (B) Aminosäuresequenzen spannungsgesteuerter Proteine im Bereich des vierten transmembranen Segments (S4): Shaker Kaliumkanal (*Drosophila melanogaster*), KvAP, bakterieller Kaliumkanal (*Aeropyrum pernix*), Kv1.2, Kaliumkanal des Maus (*Mus musculus*), Kv2.1, Kaliumkanal (Maus), Ci-VSP, VSP der Schlauchseescheide (*Ciona intestinalis*) und Ci-Hv, der Hv-Protonenkanal der Schlauchseescheide. Polare Endgruppen Arginin (R) und Lysin (K) sind rot markiert. (C) Der Spannungssensor reagiert auf Änderungen des Membranpotenzials vom Ruhepotenzial zu positiven Potenzialen durch eine Auswärtsbewegung des S4-Segments. Die Richtung des elektrischen Felds (angedeutet durch intra- und extrazelluläre +/- Ladung) gibt sich aus der Verteilung ionischer Überschussladung an der Membrangrenzfläche.

SCIENCE PRODUCTS GmbH
for Research and Therapy

Amplifiers
Data Acquisition and Data Analysis Systems
Electrodes, Wires and Glasses
Micropipette Pullers, Microforges and Bevelers
Micromanipulators
Microinjection Systems, Perfusion Systems
Stereotaxic Instruments
Stimulators and Stimulus Isolators
Tables and Faraday Cages
Temperature Controllers ... and more!

SCIENCE PRODUCTS GmbH
Hofheimer Str. 63 · 65719 Hofheim
Tel.: 06192/ 901396 · Fax: 06192/901398
info@science-products.com · www.science-products.com

Abb. 2: Künstliche Proteine mit spannungsabhängiger Fluoreszenz. (A) FlaSh besteht aus dem Shaker Kv-Kanal mit einem fluoreszenten Protein (GFP), das in den C-Terminus des Kvs eingefügt ist. (B) VSFP1 besteht aus dem Spannungssensor des Kv2.1 Kaliumkanals (S1 bis S4) und einem Tandem aus blau (CFP) und gelb (YFP) fluoreszierenden Proteinen. In VSFP2 ist der Kv2.1 - Spannungssensor durch den Spannungssensor von Ci-VSP ersetzt, siehe Text. (C) Das Fluoreszenzbild (links) zeigt die Lokalisierung von VSFP2.1 in der Plasmamembran transformierter PC12-Zellen. Der Kalibrierungsstrich entspricht 30 μm. (D) Änderung des Verhältnisses von gelber (YFP) zu blauer (CFP) Fluoreszenz von VSFP2.1 bei pulsartiger Änderung der Membranspannung vom Haltepotenzial (-70 mV) zu Testpotenzialen zwischen -140 bis +40 mV in PC12-Zellen bei 35 °C. Das Testprotokoll besteht aus einem 500 ms langen Testpuls wobei das Testpotenzial zwischen Einzelmessungen jeweils um 20 mV inkrementiert ist. (E) Maximale Fluoreszenzantwort aus Messungen wie in (D) als Funktion des Testpotenzials. Die Messdaten einzelner Zellen (schwarze Symbole) lassen sich gut durch eine Boltzmann-Funktion approximieren (rote Kurve) mit einem Halb-Aktivierungspotenzial ($V_{1/2}$) von -68 mV. (F) Zeitkonstante der Fluoreszenzaktivierung von VSFP2.1 als Funktion des Testpotenzials. Daten aus (Dimitrov et al. 2007).

Spannungssensor (VSD mit Segment S1 bis S4) und einer intrazellulären Domäne mit Phosphatase-Aktivität, die an die Stelle der kanalbildenden Segmente S5 und S6 des Kv-Proteins tritt. Die Struktur- und Sequenz-homologien dieser spannungsgesteuerten Proteine legten den Schluss nahe, dass der Bereich S1 bis S4 eine eigenständige funktionale Einheit darstellt, die spannungsabhängige Aktivierungsvorgänge in nachfolgenden Effektor-domänen steuert. Funktionelle Untersuchungen an diesen Proteinen unterstützten diese Hypothese. Die strukturelle und funktionelle Eigenständigkeit der Spannungssensoreinheit dokumentiert sich weiterhin in der Existenz des Hv-Kanals, der aus einer, vermutlich dimeren, Anordnung protomerer, Kv-homologer Spannungssensoreinheiten ohne nachfolgende Effektor-domäne besteht (Abbildung 1A). Die Frage, auf welche Weise natürliche VSDs die Membranspannung

detektieren, wurde in den letzten 15 Jahren intensiv erforscht. Seit langem ist bekannt, dass die Aktivierung des Spannungssensors durch Membranpotenzialänderung einen kapazitiven ionischen Strom verursacht, der durch Bewegung positiver Partialladungen des Proteins senkrecht zur Membran erzeugt wird und als Sensorstrom (sensing current), in Ionenkanälen auch als Torstrom (gating current), bezeichnet wird. Gemessen wurde dieser Effekt erstmals von Clay Armstrong und Francisco Bezanilla Anfang der 70er Jahre im Zusammenhang mit der Aktivierung des Nav-Kanals im Tintenfischaxon. Nach der erfolgreichen Klonierung der Kv-Kanäle der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*) Ende der 80er Jahre waren es vor allem Untersuchungen an gezielt mutierten Kv-Proteinen, die halfen, die molekulare Identität der mobilen Ladungen in der VSD-Struktur aufzuklären. Danach geht der überwiegende

Anteil des Sensorstroms auf Bewegungen des S4-Segments zurück, welches eine Reihe polarer Aminosäuren enthält, die bei physiologischem pH überwiegend positiv geladen sind (Aggarwal und MacKinnon 1996). Abbildung 1B zeigt die Aminosäuresequenz im S4-Bereich verschiedener VSDs. Allen S4-Sequenzen gemeinsam ist eine Reihe positiv geladener Seitenketten (R und K) in jeder dritten Position mit lipophilen Seitenketten in den Zwischenpositionen. Bei der Aktivierung eines Kv-Kanals vom Ruhezustand (geschlossener Zustand; geringe K^+ -Permeabilität) in den maximal depolarisierten Zustand (geöffneter Zustand; hohe K^+ -Permeabilität) führt das S4-Segment eine Bewegung in Richtung des extrazellulären Halbraumes aus, wobei jede protomere Kv-Einheit effektiv etwa drei Elementarladungen (Kv1-Subtyp) über die Lipidbarriere von der zytosolischen zur extrazellulären Grenzfläche transportiert (Abbildung 1C). Die mikroskopischen Koordinaten dieser Bewegung und die zugrunde liegende Änderung der Protein/Lipid-Konfiguration sind noch nicht vollständig verstanden. Einige experimentelle Befunde deuten darauf hin, dass trotz der Größe der transportierten Ladung die effektive Distanz der S4-Bewegung im Vergleich zur nominalen Dicke der Plasmamembran klein ist. Einige dieser Beobachtungen sprechen ferner für einen Kontakt des S4-Segments mit Micro-Spalten hoher Ionenleitfähigkeit im Innern der Membran was lokal die effektive Dicke der Lipidbarriere reduzieren und die elektrische Feldstärke erhöhen würde. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Funktionsweise natürlicher Spannungssensoren auf einer spannungsabhängigen Konfigurationsänderung des Proteins beruht, welche durch die Kräfte getrieben wird, die das elektrische Membranfeld auf die positive Ladungen in den Seitenketten des S4-Segments ausübt. Das Design künstlicher spannungsabhängiger fluoreszierender Proteine macht sich genau dieses Wirkungsprinzip zunutze.

Künstliche Proteine mit spannungsabhängiger Fluoreszenz

Die Entdeckung des grün fluoreszierenden Proteins GFP (green fluorescent protein) der Kammqualle (*Aequorea victoria*) durch Osamu Shimomura (2008 Nobelpreis für Chemie) und die spätere Klonierung durch Douglas Prasher hat ein neues Zeitalter der Sichtbarmachung zellphysiologischer Prozesse in lebenden Organismen eingeleitet. Das erste Spannungssensorprotein mit einer GFP-Einheit wurde 1997 von Micah Siegel und Ehud Isacoff an der Universität von Kalifornien in Berkeley beschrieben. Bei diesem,

Exkurs 2

Resonanter Energietransfer zwischen benachbarten Fluoreszenzmolekülen

FRET (fluorescence resonance energy transfer) ist ein photophysikalischer Prozess, durch den die elektronische Anregungsenergie eines fluoreszenten Donor-Moleküls resonant auf ein benachbartes Akzeptormolekül übertragen wird. Die Resonanz tritt auf, wenn die Energie des angeregten Akzeptorzustands mit der Energie des fluoreszenten Donorzustands hinreichend übereinstimmt. Da die Wahrscheinlichkeit für den Energietransfer sehr empfindlich vom Abstand der beiden Molekülzentren zwischen 1 und 10 nm abhängt, ermöglicht FRET die optische Messung molekularer Abstände in einem Bereich weit unterhalb der Lichtwellenlänge. Veränderungen des Donor-Akzeptor-Abstands werden dabei als Veränderung

der Lebensdauer oder Amplitude der Donor Fluoreszenz, oder, falls der Akzeptor ebenfalls fluoresziert, auch als Veränderung des Verhältnis aus Donor und Akzeptor Fluoreszenz detektiert. Zu beachten ist, dass FRET auch stark von der relativen Orientierung des Donor/Akzeptor-Paares abhängt. In der Zellbiologie werden diese Eigenschaften von FRET vielfach zur in-situ Charakterisierung von Proteinkonformationen und Protein-Protein-Wechselwirkungen genutzt. Die quantenmechanische Grundlage des Energietransfers ist die elektrostatische Coulomb-Wechselwirkung zwischen den Ladungsverteilungen der angeregten elektronischen Zustände des Donor- und Akzeptormoleküls. Die theoretische Beschreibung wurde von Theodor Förster in den 40iger Jahren entwickelt: Unter der Annahme, dass die Koppelung der Donor- und Akzeptor Zustände durch Dipol-Dipol-Wechselwirkung erfolgt und klein gegenüber der thermischen Koppelung mit der Umgebung ist, ergibt sich für

die Rate des Energietransfers $k_F = (1/\tau_D) (R_F/R)^6$, mit τ_D der Lebensdauer des angeregten Donorzustands in Abwesenheit des Akzeptors, R der Abstand zwischen Donor und Akzeptor ($R > 1$ nm) und R_F der Förster-Radius, d.h. der Abstand, bei dem die Relaxation des Donors in den Grundzustand mit gleicher Wahrscheinlichkeit durch intermolekularen Energietransfer oder durch Emission eines Fluoreszenzphotons und interne Konversion erfolgt. Der Effizienz des intermolekularen Transfers der Anregungsenergie in Dipolnäherung nimmt daher mit der sechsten Potenz des intermolekularen Abstands R ab. Der Förster-Radius wiederum hängt ab vom spektralen Überlapp zwischen der Emission des Donors und Absorption des Akzeptors, sowie von der relativen Orientierung der beiden Übergangsdipole. Im Fall isotroper Ensemble-Verteilung der Dipole ergibt sich für CFP und YFP als Donor-/Akzeptor-Paar ein Förster-Radius von 4.7 nm.

World Precision Instruments Laboratory Equipment for the Life Sciences

Precision Stereotaxic Instruments

WPI Single or Dual Manipulator Stereotaxic Instruments - also available: Digital Readout and UMP3 Microinjection Pump & many other accessories

Meet us at the Goettingen Neurobiology Conference!
Goettingen March 25-29, 2009
Booth 34

Now available

Get your free copy
of our new WPI
Catalogue 2009

find your tools at...
www.wpi-europe.com

T +49 30 6188345
F +49 30 6188670
E-mail wpide@wpi-europe.com

FlaSh (fluorescent shaker) genannten, Protein war GFP nahe der Porendomäne in den C-Terminus des Shaker Kv-Kanals (Kv1) eingefügt (Siegel und Isacoff 1997; Abbildung 2 A). Ein anderes Konzept wurde in dem Labor der Autoren am RIKEN Institut für Hirnforschung in Tokio verfolgt und führte zu der Entwicklung eines VSFP1 (voltage-sensitive fluorescent protein) genannten Proteins (Sakai et al. 2001). VSFP1 besteht aus der VSD-Einheit eines spannungs-gesteuerten Kaliumkanals (Kv2.1) und einem Tandem aus einem blau fluoreszierenden Protein CFP (cyan fluorescent protein) und einem gelb fluoreszierenden Protein YFP (yellow fluorescent protein) als Fluoreszenz-Effektoreinheit (Abb. 2B). Die Eigenschaft des CFP/YFP Tandems, Konformations-übergänge des Spannungssensors in Fluoreszenzänderungen umzusetzen, basiert dabei auf einer resonanten Koppelung der CFP und YFP Fluoreszenz, die sehr empfindlich auf Veränderungen der relativen

Konfiguration der CFP und YFP-Einheiten reagiert (FRET: fluorescence resonant energy transfer; siehe Exkurs 2). Messungen an VSFP1 in einer kultivierten menschlichen Zelllinie (HEK-293; human embryonic kidney cells) bestätigten das Funktionsprinzip des VSFP1 Proteins, d.h. die Eigenschaft, als Funktion der Membranspannung seine CFP/YFP-Fluoreszenzemission zu ändern. Es stellte sich aber heraus, dass sowohl VSFP1 als auch FlaSh (und eine weitere, hier nicht näher beschriebenen Variante, genannt SPARC) in transformierten neuronalen Primärkulturen in nur sehr geringer Dichte in die Plasmamembran integriert werden und sich stattdessen in innerzellulären Membranen u.a. des endoplasmatischen Retikulums anreichern. Von Kv-Proteinen ist bekannt, dass diese im Retikulum zurückgehalten werden, wenn sie nicht die korrekte Faltung oder Oligomerisierung aufweisen. Kv-Proteine enthalten dazu Signalsequenzen, die au-

ßerhalb des Retikulums einen retrograden Transport des Proteins auslösen und die durch korrekte Faltung und Oligomerisierung maskiert werden. Da sowohl VSFP1 als auch FlaSH Elemente des Kv-Kanals benutzen, war es naheliegend, anzunehmen, dass diese Proteine unmaskierte Rückhaltesignale enthielten. Zur Lösung des Rückhalteproblems suchten wir daher nach Möglichkeiten, die Kv-Elemente in VSFP1 teilweise oder ganz durch Elemente prokaryotische oder niedereukaryotischer Kvs zu ersetzen. Außerdem suchten wir nach alternativen VSDs aus natürlichen Proteinen, für die keine Notwendigkeit der Oligomerisierung besteht. Dabei half schließlich eine Entdeckung von Yasushi Okamura und Mitarbeitern am Okazaki Institut für integrative Biowissenschaft (Japan), die im Genom der Schlauchseescheide (*ciona intestinalis*) eine Spannungssensordomäne in einem Gen fanden, das überraschenderweise nicht für einen Ionenkanal, sondern ein Phosphatase-Enzym codiert (Abbildung 1A). Es stellte sich heraus, dass die Phosphatase-Aktivität des Genprodukts (VSP; voltage sensor-containing phosphatase) in der Tat von der Membranspannung abhängt und dass das Protein in Zellmembranen auch als Monomer existieren kann. Als wir den VSP-Spannungssensor anstelle des Kv-VSDs in VSFP1 einfügten, erhielten wir ein Protein, das wir VSFP2 nannten und das eine sehr gute Lokalisierung in der Plasmamembran transformierter Nervenzellen zeigt (Abbildung 2C, Abbildung 3A). Das Rückhalteproblem war damit also gelöst. Für die gewünschte Funktion des Proteins waren allerdings noch eine Reihe weiterer Modifikationen erforderlich. Die wichtigste bestand darin, den Aktivierungsbereich des Spannungssensors an die Potenzialverhältnisse in erregbaren Säugetierzellen anzupassen. Während der VSP-Spannungssensor der Schlauchseescheide bei Membranpotenzialen größer als +50 mV aktiviert, liegt der Arbeitsbereich für die gewünschte Funktion des VSFP-Proteins in Säugetierneuronen im Bereich zwischen dem Ruhepotenzial dieser Zellen (~ -70 mV) und der Amplitude von Aktionspotenzialen (~ +10 mV). Da die Aktivierung des Spannungssensors maßgeblich von der detaillierten Ladungsverteilung im Bereich des S4-Segments bestimmt wird, untersuchten wir eine Reihe von Proteinvarianten mit ladungsverändernden Punktmutationen in S4. Dabei fanden wir eine Mutation (R217Q), die das Potenzial der Halbaktivierung des Sensors (d.h. des Zustandes, wo der Sensor mit gleicher Wahrscheinlichkeit im aktivierten und deaktivierten Zustand vorliegt)

Abb. 3: Charakterisierung der Sensor- und Fluoreszenzaktivierung von VSFPs. Die Aktivierungskinetik von VSFP2.3 und VSFP3.1 wurde mit simultaner Messung des Sensorstroms und des Fluoreszenzsignals in PC12-Zellen als Antwort auf pulsiformige Testpotenziale unter Verwendung ähnlicher Protokolle wie in Abb. 2D bestimmt. Die Aktivierungszeitkonstanten ergeben sich aus der Approximation des gemessenen Sensorstroms (schwarz) und Fluoreszenz (blau) mit einfachen Exponentialfunktionen (rot). Die verwendeten Testprotokolle sind als Einsatz zu den Messkurven gezeigt. (A) Zeitkonstanten von VSFP2.3 als Funktion des Testpotenzials. (B) Während sich die Sensorkinetik von VSFP3.1 nicht wesentlich von VSFP2.3 unterscheidet, zeigt die Fluoreszenzantwort (CFP Fluoreszenz) von VSFP3.1 ein zweiphasiges Verhalten mit einer schnellen (geschlossene Symbole) und langsamen (offene Symbole) Zeitkonstante. Daten aus (Lundby et al. 2008).

von +80 mV nach -60 mV verschiebt. Ein weiterer wichtiger Schritt bestand darin, die Koppelung zwischen der VSD-Sensoreinheit und der CFP/YFP-Effektoreinheit zu verbessern. Dazu testeten wir eine Reihe von Proteinvarianten mit unterschiedlicher Länge des Peptidlinkers zwischen S4 und der Fluoreszenz-Effektoreinheit und identifizierten die optimale Linkerkonfiguration nach der Höhe der durch VSD-Aktivierung hervorgerufenen Fluoreszenzänderung. Das aus dieser Optimierung hervorgegangene Protein mit der Bezeichnung VSFP2.1 zeichnet sich durch eine spannungsabhängige Fluoreszenz mit einer Steigung von 8 % Fluoreszenzänderung (Verhältnis von YFP zu CFP-Emission) pro 100 mV Spannungsänderung in transformierten PC12-Zellen (eine Linie modifizierter Zellen neuronalen Ursprungs der Maus) aus (Dimitrov et al. 2007). Zur experimentellen Charakterisierung des Proteins wurden einzelne Zellen einer transformierten PC12-Zellkultur zur externen Kontrolle der Membranspannung mit einer ionenleitfähigen Elektrode innerviert (Voltage-Clamp der Gesamtzelle; „whole-cell“ Patch-Clamp-Konfiguration). Die kinetischen Eigenschaften der Proteinfluoreszenz ergeben sich aus den Messungen der Fluoreszenzantworten auf sprunghafte Änderungen des geklemmten Membranpotenzials der Zelle (Abbildung 2D). Die gemessenen Fluoreszenzantworten folgen einem exponentiell asymptotischen Zeitverlauf, der sich durch eine oder mehrere Zeitkonstanten beschreiben lässt. Die auf diese Weise bestimmten dominierenden Zeitkonstanten der VSFP2.1-Aktivierung im physiologisch interessanten Potenzialbereich liegen zwischen 80 ms (-70 mV) und 20 ms (+10 mV; Abbildung 2D). Es stellt sich also heraus, dass die Fluoreszenz von VSFP2.1 zwar die gewünschte Potenzialempfindlichkeit besitzt, auf Potenzialänderungen aber relativ langsam reagiert. Dabei ist klar, dass die langsame Gleichgewichtseinstellung von VSFP2.1 für die Messung schneller elektrischer Potenziale in neuronalen Membranen von Nachteil ist. Es stellte sich daher die Frage, durch welche Strukturelemente die Kinetik des Proteins begrenzt wird und wie sich diese Begrenzung überwinden lässt.

Kinetik spannungsabhängiger Fluoreszenzproteine

VSFP-Proteine erlangen ihre Funktion durch Koppelung eines VSD-Spannungssensors mit einer fluoreszierenden Effektoreinheit, so dass sich Konformationsübergänge der VSD auf die optischen

Abb. 4: Spannungsabhängige Fluoreszenzproteine eignen sich zum Auslesen neuronaler Signale. (A) Fluoreszenzantworten im gelben (YFP) und blauen (CFP) Spektralbereich, sowie dem Verhältnis aus beiden Signalen (YFP/CFP) von VSFP2.1, hervorgerufen durch Aktionspotenziale einer Maus-Mitralzelle (V-Transient, oberste Reihe) in spannungsgeklammten PC12-Zellen (Dimitrov et al. 2007). Durch Mittelung über 50 Einzelmessungen wird ein Signal/Rauschverhältnis mit guter Auflösung einzelner Aktionspotenziale erreicht. (B) Simulation des elektrischen Antwortverhaltens einer Mitralzelle auf Stimulation des olfaktorischen Nervis, siehe (Dimitrov et al. 2007). Die gezeigten YFP-Signale entsprechen Einzelmessungen, die YFP/CFP-Antwort entspricht einer Mittelung über 90 Einzelmessungen von VSFP2.1. (C) Fluoreszenz einer akut mit VSFP2.1 transfizierten Pyramidalzelle in neuronaler Primärkultur (oberes Bild; Kalibrierungsstrich 100 µm), zusammen mit den Fluoreszenzantworten auf Injektion eines hyperpolarisierenden Stroms (500 ms). Daten aus (Baker et al. 2008).

Eigenschaften der Fluoreszenzdomäne übertragen. Das dynamische Verhalten des VSD-Spannungssensors lässt sich direkt durch Messung des VSD-Sensorstroms unabhängig von der Fluoreszenzantwort des Proteins analysieren (Lundby et al. 2008). Parallel durchgeführte Messungen von Sensorstrom und Fluoreszenzemission von VSFP2.3 (einer verbesserten Version von VSFP2.1) in PC12-Zellen ergaben das bemerkenswerte Ergebnis, dass der VSFP2.3-Spannungssensor mit einer hundertfach schnelleren Zeitkonstante auf Veränderungen der Membranspannung reagiert als die Hauptkomponente der zugehörigen Fluoreszenzantwort (Abbildung 3A). Diese Messungen zeigen, dass die Bewegung der Sensorladung in VSFP2.3 sehr schnell erfolgt und dass die langsame Fluoreszenzantwort durch einen nachgeordneten Prozess bestimmt wird. Wir fragten uns also, wie ein Proteindesign aussehen könnte, das die Fluoreszenzantwort direkt an die schnelle S4-Bewegung ankoppelt. Diese Überlegungen führten uns zu einem Proteindesign, mit der Bezeichnung VSFP3.1, welches aus einem einzelnen CFP als Fluoreszenzeffektor besteht, der über einen verkürzten Linker aus drei Aminosäuren mit S4 verbunden ist (Lundby et al. 2008; Abbildung 3B). VSFP 3.1 zeigt eine

deutlich zweiphasige Fluoreszenzantwort mit einer dominanten schnellen Komponente, die direkt der schnellen Ladungsbewegung des VSD-Sensors folgt und einer zweiten, langsameren Komponente, die in ihrem Zeitverlauf der Hauptkomponente der Fluoreszenzantwort vom VSFP2.1 entspricht (Abbildung 3C). Die Fluoreszenzeigenschaften des VSFP3.1-Proteins belegen, dass es grundsätzlich möglich ist, die schnellen Ladungsbewegungen des Sensors in ein zeitnahes Fluoreszenzsignal umzusetzen, das geeignet ist, schnellen elektrischen Membranpotenzialen zu folgen. Auf der anderen Seite weist das VSFP3.1-Protein eine vergleichsweise geringe Spannungsempfindlichkeit von 1.2 % Fluoreszenzänderung pro 100 mV Membranspannungsänderung auf. Dieser Wert wird von neueren Varianten mit einer gegenüber VSFP3.1 verbesserten Funktion des Fluoreszenzeffektors bereits deutlich übertroffen.

Um den Anwendungsbereich der verschiedenen VSFP-Proteine zur Messung neuronaler elektrischer Erregung abzuschätzen, untersuchten wir ihr Signalverhalten in kortikalen Pyramidalzellen mittels Computersimulation. Diese Untersuchungen ergaben, dass eine VSFP-Empfindlichkeit von 5 % pro 100 mV ausreicht,

um Aktionspotenziale in Zellkörpern einzelner Neurone mit einem Signal/Rauschverhältnis besser als zwei zu detektieren. Aktuelle Arbeiten zur Weiterentwicklung bestehender VSFP-Proteinvarianten zielen darauf ab, dies experimentell an intaktem Gewebe zu zeigen und die Spannungsempfindlichkeit der VSFP-Proteine weiter zu verbessern. Von großer Wichtigkeit in diesem Zusammenhang ist es, den Ursprung der Konfigurationsänderungen zu verstehen, die die Kinetik der Fluoreszenzantworten bestimmen, insbesondere den Ursprung der langsamen Komponente der Fluoreszenz. Francisco Bezanilla und Mitarbeiter an der Universität in Chicago haben dazu ein Drei-Zustands-Modell der S4-Aktivierung vorgeschlagen, welches aus einem schnellen Übergang der Ladungsbewegung in einen aktivierten Zwischenzustand und einer nachfolgenden langsameren Relaxation in den aktivierten Endzustand besteht, die ohne energetische Beiträge durch bewegte Sensorladung erfolgt. Einige experimentelle Ergebnisse deuten darauf hin, dass es sich dabei um eine Relaxation der S4-Helixstruktur handeln könnte (Villalba-Galea et al. 2008). Modifikationen, die die unrelaxierte Konfiguration des S4-Segments stabilisieren, erscheinen daher besonders interessant für die Entwicklung zukünftiger VSFP-Proteine mit verbesserten Signaleigenschaften.

Fazit und Perspektiven

Der bisherige Fortschritt bei der Entwicklung genetisch codierter Spannungssensoren wurde erreicht durch Tests an einer großen Zahl von VSFP-Konstrukten. Diesen Konstrukten lag ein weitgehend rationales Design zugrunde, welches durch Erkenntnisse zur Funktion natürlicher spannungsabhängiger Proteine motiviert war. Es kann davon ausgegangen werden, dass künftige Fortschritte bei der Aufklärung der molekularen Mechanismen in Ionenkanälen und anderen spannungsgesteuerten Proteinen die Entwicklung der VSFP-Proteine weiter vorantreiben wird. Als Test für die Funktion der hier beschriebenen Sensoren und deren Varianten konnte gezeigt werden, dass unter sozusagen 'idealen' Bedingungen, wie z.B. in neuronalen Zelllinien (Abbildung 4A) und neuronalen Primärkulturen (Abbildung 4B), sich elektrische Signale mit Einzelzellauflösung optisch auslesen lassen. Damit ist ein wichtiger erster Schritt auf dem Weg zum eigentlichen Ziel, der hochauflösenden Abbildung elektrischer Erregung in lokalen kortikalen Netzwerken des Gehirns, getan. Zur Erreichung dieses

Ziels bedarf es weiterer Verbesserungen der Funktion dieser Proteine, insbesondere ihrer Spannungsempfindlichkeit. Darüber hinaus wird die erfolgreiche Anwendung im Gehirngewebe von einer Reihe weiterer Elemente abhängen. Dazu gehören geeignete Methoden des Gentransfers, um eine hohe Expression in Membranen der gewünschten neuronalen Populationen zu erzeugen. Um elektrische Potenziale in Zellkörpern einzelner Neurone aufzulösen, wird das erforderliche Expressionsniveau unserer Erwartung nach bei einigen 100 Indikatorproteinen pro μm^2 Zellmembran liegen. Das erreichbare Signal/Rauschverhältnis wird außerdem von instrumentellen Parametern der optischen Messkonfiguration wesentlich mitbestimmt. Neue Entwicklungen der optischen Messtechnik, die zu einer Verbesserung der Signal/Rauschverhältnisse bei der Detektion des Fluoreszenzsignals beitragen, haben somit einen direkten Einfluss auf die Genauigkeit, mit der die Dynamik des neuronalen Netzwerkes aus potenziometrischen Daten rekonstituierbar ist. Die Entwicklung eines optischen Fensters zur direkten Visualisierung elektrischer Erregungsvorgänge in kortikalen Netzwerken mittels genetisch codierter Fluoreszenzindikatoren ist also nur erst angestoßen, verspricht aber, das Repertoire neurophysiologischer Techniken zur Erfassung der dynamischen Prozesse in lokalen kortikalen Netzwerken entscheidend zu erweitern.

Literatur

- Knöpfel, T., Díez-García, J. und Akemann, W. (2006): Optical probing of neuronal circuit dynamics: genetically encoded versus classical fluorescent sensors. *Trends Neurosci.* 29: 160-166.
- Göbel, W. und Helmchen, F. (2008): Optische Messung neuronaler Netzwerkndynamik in 3D. *Neuroforum* 14 (2): 184-189
- Dimitrov, D., He, Y., Mutoh, H., Baker, B.J., Cohen, L., Akemann, W. und Knöpfel, T. (2007): Engineering and characterization of an enhanced fluorescent protein voltage sensor. *PLoS ONE* 5 e440: 1-5
- Lundby, A., Mutoh, H., Dimitrov, D., Akemann, W. und Knöpfel, T. (2008): Engineering of a genetically encodable fluorescent voltage sensor exploiting fast ci-VSP voltage-sensing movements. *PLoS ONE* 3 (6) e2514: 1-5
- Sakai, R., Repunte-Canonigo, V., Raj, C.D. und Knöpfel, T. (2001): Design and Characterization of a DNA-encoded voltage-sensitive fluorescent protein. *Eur J Neurosci* 13: 2314-2318
- Siegel, M.S. und Isacoff, E.Y. (1997): A genetically encoded optical probe of membrane voltage. *Neuron* 19: 735-741
- Villalba-Galea, C.A., Sandtner, W., Starace, D.M. und Bezanilla, F. (2008): S4-based vol-

tage sensors have three major conformations. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 17600-17607

Eine vollständige Literaturliste kann bei den Autoren angefordert werden

Kurzbiographien

Walther Akemann: Promotion in Physik an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (1993). Postdoktorand im Forschungszentrum Jülich (1994-96), im Labor für Organische Bauelemente der CEA in Saclay (1997-98) und im Labor für Molekulare Photophysik der CNRS in Orsay (1999). Seit 2000 wissenschaftlicher Mitarbeiter im Labor für Neuronale Schaltkreise (Prof. Thomas Knöpfel) des RIKEN Instituts für Hirnforschung in Tokio.

Thomas Knöpfel: 1978-1985 Parallelstudium der Humanmedizin und Physik. 1985 Physikdiplom (Universität Ulm, Prof. P. Fromherz), medizinische Approbation und Promotion (Institut für Hirnforschung der Universität Zürich, Prof. W. Precht, Zürich). 1992 Habilitation im Fach Physiologie (Universität Zürich). 1992-1996 Team- und Projektleiter, Ciba, Basel. 1996-1998 Forschungsaufenthalte in London, Rom und Catania. Seit 1998 Leiter des Laboratory for Neuronal Circuit Dynamics am RIKEN Brain Science Institute in Japan. Gastprofessur an der Waseda Universität (Japan) und der Universität Newcastle upon Tyne (England).

Korrespondenzadresse

PD Dr. Thomas Knöpfel
Laboratory for Neuronal Circuit Dynamics
RIKEN Brain Science Institute
2-1 Hirosawa, Wako-City
Saitama 351-0198, Japan
Tel.: +81 048 467 9740
Fax: +81 048 467 9739
E-Mail: tknopfel@brain.riken.jp