

**Molekularer Mechanismus protonenleitender
Kanalrhodopsine und protonengekoppelte
Zwei-Komponenten-Optogenetik**

D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung des akademischen Grades
d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m
(Dr. rer. nat.)
im Fach Biophysik

eingereicht an der
Lebenswissenschaftlichen Fakultät
der Humboldt Universität zu Berlin

V O N

M.Sc. Johannes Tobias Theodor Vierock

Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin:
Prof. Dr.-Ing. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät:
Prof. Dr. Bernhard Grimm

Gutachter: 1. Prof. Dr. Peter Hegemann
2. Prof. Dr. Thomas Friedrich
3. Prof. Dr. Franz Bartl

Tag der mündlichen Prüfung: 29. August 2019

*Wir wissen, wie sich das Licht bricht,
aber das Licht bleibt ein Wunder.*

ALBERT SCHWEITZER

ZUSAMMENFASSUNG

Kanalrhodopsine (ChRs) dienen als lichtaktivierte Ionenkanäle der Phototaxis motiler Algen und können heterolog exprimiert dazu verwendet werden, Ionenflüsse durch Licht zu steuern. Kationenleitende ChRs ermöglichen das Auslösen von Aktionspotentialen in Herzzellen und Neuronen und finden im Forschungsfeld der Optogenetik weite neurowissenschaftliche Verwendung. Am Besten geleitet werden von den meisten ChRs Protonen, wobei sich die Protonenselektivität einzelner ChRs stark unterscheidet und jene anderer Kationkanäle um Größenordnungen übersteigt. In der vorliegenden Arbeit wird die Protonenleitung verschiedener ChRs verglichen, der molekulare Mechanismus protonenselektiver ChRs untersucht und die Verwendung lichtaktivierter Protonenflüsse in unterschiedlichen Proteinkombinationen als Zwei-Komponenten-Optogenetik erprobt. Durch elektrophysiologische und bildgebende Verfahren konnte gezeigt werden, dass im Gegensatz zu Kanalrhodopsin-2 aus der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* (*CrChR2*) die erst vor kurzem identifizierten Kanäle *CsChR* und *Chrimson* aus den Algen *Chloromonas subdivisa* und *Chlamydomonas noctigama* fast ausschließlich Protonen leiten. Aufgrund eines außergewöhnlich rotverschobenen Anregungsmaximums bei 585 nm ist *Chrimson* jedoch von besonderem optogenetischen Interesse, da rotes Licht tiefer in biologisches Gewebe eindringt und *Chrimson* unabhängig von anderen blaulichtsensitiven Photorezeptoren angeregt werden kann. In einer ausgedehnten Mutationsstudie konnten die molekularen Bestimmungsfaktoren der Photostromkinetik, Rotlichtabsorption und hohen Protonenselektivität von *Chrimson* in dieser Arbeit identifiziert werden. Elektrophysiologische Messungen bestätigen Gemeinsamkeiten von *Chrimson* mit der Protonenpumpe *Bacteriorhodopsin* in direkter Umgebung des Retinalchromophors und offensichtlichen Unterschiede zu anderen ChRs entlang der protonenleitenden Pore, wo ein zusätzliches äußeres Tor Photostromkinetik, Lichtabsorption und Protonenselektivität entschieden mitbestimmt. Durch eine Aminosäuresubstitution zwischen Retinalbindetasche und vermuteter Pore konnte das Aktionsmaximum von *Chrimson* röter als 600 nm verschoben werden, wohingegen der Austausch titrierbarer Reste der äußeren Pore *Chrimson* in einen rot- oder grünlichtaktivierten Natriumkanal transformierte. Auch in *CsChR* und *CrChR2* erwiesen sich Glutaminsäuren entlang der Pore für eine effiziente Protonenleitung unentbehrlich und führten eingefügt in den extrazellulären Halbkanal der Protonenpumpe *CsR* aus *Coccomyxa subellipsoidea* zu passiven Einwärtsströmen im späten Photozyklus. In *CrChR2* ändert sich die Protonenselektivität im Laufe des Photozyklus und drei unterschiedliche leitende Zustände verschiedener Protonenselektivität konnten in zeitaufgelösten Ionenselektivitätsmessungen nach Anregung mit einem Laserblitz bestimmt werden. Das molekulare Verständnis der Protonenleitung von ChRs ermöglicht deren gezielte optogenetische Verwendung und fördert die Entwicklung neuer optogenetischer Werkzeuge. Als protonengekoppelte Zwei-Komponenten-Optogenetik wurden schließlich protonenleitende und anionenleitende ChRs unterschiedlicher Farbsensitivität sowie lichtaktivierte Protonenpumpen und protonenaktivierte Ionenkanälen miteinander kombiniert und neue optogenetische Perspektiven eröffnet.

ABSTRACT

Channelrhodopsins (ChRs) are light-gated ion channels from green algae. Expressed in host cells they are used to control ion fluxes by light. Cation-conducting ChRs trigger action potentials in neurons or heart cells and are widely applied in Optogenetics and Neurosciences. In Chlorophyte ChRs proton selectivity is orders of magnitude higher than in other cation channels and protons contribute significantly to photocurrents at neutral pH. This thesis compares proton conductance of different ChRs, examines the molecular mechanism of proton selective ChRs and explores the usage of light regulated proton fluxes in two component optogenetics.

The presented experiments focus on the spectroscopically well described channelrhodopsin-2 from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* (*CrChR2*) and the only recently discovered and - as herein shown - highly proton selective channels *CsChR* and Chrimson from the algae *Chlamydomonas subdivisa* and *Chlamydomonas noctigama*. Due to an exceptionally red shifted activation maximum at 585 nm Chrimson is of major optogenetic interest, as red light penetrates deeper into biological tissue and allows the independent activation of Chrimson in the presence of other blue light activated photoreceptors. By an extended mutagenic study and a detailed biophysical characterization the molecular determinants of fast photocurrents, red light activation and high proton selectivity of Chrimson were identified. Electrophysiological recordings showed that the retinal binding pocket of Chrimson resembles the proton pump bacteriorhodopsin, while the putative proton conducting pathway of Chrimson differs from other ChRs and features an additional outer gate in the extracellular half pore. A single point mutation close to the retinal chromophore shifts peak absorption of Chrimson beyond 600 nm; further red than all so-far described microbial rhodopsins. Substitutions of glutamic acids close to the outer gate reduce proton conductance and convert Chrimson to an operational sodium channel with red or green light activation. Also for *CrChR2* and *CsChR* glutamic acids along the pore are important for proton conductance although the individual contribution of conserved side chains to proton selectivity differs from Chrimson. Single turnover electrophysiological recordings after laser flash excitation captured the temporal evolution of proton fluxes and helped to kinetically distinguish different ion conducting states that lead in conjunction with spectroscopic results to unifying photocycle models for channel activation and light-adaptation of *CrChR2* and Chrimson.

The mechanistic insights of this work capture the minor molecular differences that lead to active or passive proton transport in microbial rhodopsin, facilitate the adequate usage of ChRs in optogenetic applications and pave the way for the future improvements of red light-activated optogenetic tools. Finally, proton and anion selective ChRs of distinct color as well as light-driven proton pumps and proton-activated ion channels are combined with each other as two component optogenetic tools and open up new optogenetic prospects.

DANKSAGUNG

Widmen möchte ich diese Arbeit allen wissenschaftlichen Diskussionspartnern der letzten Jahre, meinen Freunden, meiner Familie, meinen Kindern und ganz besonders meiner Frau Carla.

Besonders bedanke ich mich bei Prof. Dr. Peter Hegemann für die Bereitstellung eines exzellenten Forschungsumfeldes und seine vielseitige Unterstützung. Die unvoreingenommene kritische Betrachtung kleinster experimenteller Auffälligkeiten ohne dabei größere Zusammenhänge aus dem Auge zu verlieren sowie die unermüdliche Bereitschaft, neue Daten und Interpretationen zu diskutieren, wird mir auch in Zukunft Vorbild und Inspiration bleiben. Nicht genug bedanken kann ich mich weiterhin für die exzellente und zuverlässige Unterstützung durch Tharsana Tharmalingam, Olivia Hertel und Sandra Augustin in der Molekularbiologie, Thi Bich Thao Nguyen bei der Proteinaufreinigung sowie Maila Reh und Altina Klein bei der Vorbereitung elektrophysiologischer Experimente und der Organisation des Laborlebens. Weiterhin hatte ich das Glück mit exzellenten Wissenschaftlern in Deutschland, den USA und Japan zusammenzuarbeiten. Für die exzellente Vorarbeit und Zusammenarbeit zur Etablierung der Zwei-Komponenten-Optogenetik bedanke ich mich bei Sonja Minniberger, Kyoko Tsunoda, Dr. Satoshi Tsunoda und Paul Thimm. Für die ausdauernde Unterstützung und große Hilfe bei der Entschlüsselung des molekularen Mechanismus des rotlichtaktivierten Kanalrhodopsins Chrimson bedanke ich mich bei Dr. Christiane Grimm, Dr. Benjamin S. Krause, Noam Nitzan, Dr. Tomohiro Nishizawa, Oda Kazumasa, Joel Kaufmann, Prof. Dr. Franz Bartl und Prof. Dr. Osamu Nureki. Für die gemeinsame Achterbahnfahrt durch den Photozyklus von *CrChR2* bedanke ich mich bei Dr. Jens Kuhne, Max-Aylmer Dreyer, Stefan Tennigkeit, Dr. Jonas Wietek und Prof. Dr. Klaus Gerwert. Für eine hervorragende Ausgangslage zur Untersuchung des Pumpkanaldualismus der Protonenpumpe CsR bedanke ich mich bei Dr. Roman Fudim und Dr. Arend Vogt. Für die vielseitige neurobiologische Unterstützung zur Etablierung neuer optogenetischer Werkzeuge bedanke ich mich bei Dr. Benjamin Rost, Dr. Alberto Perez-Alvarez, Prof. Dr. Thomas Oertner, Dr. Emily Ferenczi, Prof. Dr. Karl Deisseroth sowie Silvia Rodriguez-Rozada und Prof. Dr. Simon Wiegert. Bedanken möchte ich ebenfalls bei Prof. Dr. Andreas Hermann und Dr. Thomas Korte für den Zugang zum konfokalen Mikroskop.

Für die Begutachtung dieser Arbeit bedanke ich mich bei Prof. Dr. Franz Bartl, Prof. Dr. Thomas Friedrich, Prof. Dr. Peter Hegemann sowie beim Vorsitzenden der Kommission Prof. Dr. Andrew Plested. Besonders dankbar bin ich auch meinen geschätzten Kolleginnen und Freundinnen Dr. Franziska Schneider-Warme und Dr. Christiane Grimm sowie meinem Vater Ronald Vierock für das Korrekturlesen dieser Arbeit. Für die finanzielle Unterstützung bedanke ich mich bei der „Berlin International Graduate School of Natural Sciences and Engineering“. Der gesamten Arbeitsgruppe möchte ich für die tolle Arbeitsatmosphäre, die unzähligen kleinen Aufmerksamkeiten und die unermüdliche Unterstützung danken - es hat Spaß gemacht mit euch! Meinen Freunden und meiner Familie danke ich für ihr fortwährendes Verständnis, ihre vielseitige Hilfe und den festen emotionalen Halt! Danke euch allen!

Folgende Teile dieser Arbeit wurden bereits in wissenschaftlichen Fachzeitschriften begutachtet und publiziert:

E.A. Ferenczi*, **J. Vierock***, K. Atsuta-Tsunoda, S.P. Tsunoda, C. Ramakrishnan, C. Gorini, K. Thompson, S.Y. Lee, A. Berndt, C. Perry, S. Minniberger, A. Vogt, J. Mattis, R. Prakash, S. Delp, K. Deisseroth und P. Hegemann. (2016) Optogenetic approaches addressing extracellular modulation of neural excitability. *Scientific reports*, 6, 1–20

J. Vierock, C. Grimm, N. Nitzan, P. Hegemann. (2017) Molecular determinants of proton selectivity and gating in the red-light activated channelrhodopsin Chrimson. *Scientific Reports*, 7(1):1–15

C. Grimm*, **J. Vierock***, P. Hegemann und J. Wietek. (2017) Whole-cell Patch-clamp Recordings for Electrophysiological Determination of Ion Selectivity in Channelrhodopsins. *Journal of Visualized Experiments*, (123):1–8

J. Kuhne*, **J. Vierock***, S.A. Tennigkeit, M. Dreier, J. Wietek, D. Petersen, K. Gavriljuk, S.F. El-Mashtoly, P. Hegemann und K. Gerwert. (2019) Unifying photocycle model for light adaptation and temporal evolution of cation conductance in channelrhodopsin-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, p. 201818707

K. Oda*, **J. Vierock***, S. Oishi*, S. Rodriguez-Rozada, R. Taniguchi, K. Yamashita, J.S. Wiegert, T. Nishizawa, P. Hegemann und O. Nureki. (2018) Crystal structure of the red light-activated channelrhodopsin Chrimson. *Nature Communications*, 9(1):3949

R. Fudim*, M. Szczepek*, **J. Vierock**, A. Vogt, A. Schmidt, G. Kleinau, P. Fischer, F. Bartl, P. Scheerer und P. Hegemann (2019) Design of a light-gated proton channel based on the crystal structure of *Coccomyxa* rhodopsin. *Science Signaling*, 12(573)

*Diese Autoren trugen gleichermaßen zu den entsprechenden Arbeiten bei.

Vorgestellt wurden Teile dieser Arbeit auf folgenden wissenschaftlichen Konferenzen:

J. Vierock. (2013) Engineering of new genetically encoded photoswitchable ion channels by Dual-component optogenetics. *Ringberg-Meeting: Photoreceptors 2013*, Tegernsee, Deutschland, **Vortrag.**

J. Vierock, E.A. Ferenczi, K. Atsuta-Tsunoda, K. Deisseroth und P. Hegemann. (2014) Expanding the optogenetic toolbox by a Two Component Approach. *Channelrhodopsin et al.: Optogenetic tools and applications*, Würzburg, Deutschland, **Poster.**

J. Vierock (2016) High proton selectivity of the red-shifted channelrhodopsin Chrimson. *International Workshop: Proton and Proton-coupled Transport*, Berlin, Deutschland, **Vortrag.**

J. Vierock (2016) High proton selectivity of the red-shifted channelrhodopsin Chrimson. *17th International Conference on Retinal Proteins*, Potsdam, Deutschland, **Vortrag.**

J. Vierock und P. Hegemann. (2018) Temporal evolution and molecular determinants of proton conductance in channelrhodopsins. *Gordon Research Seminar and Conference: Ligand Recognition and Molecular Gating*, Ventura, Kalifornien, Vereinigte Staaten von Amerika, **Vortrag und Poster.**

J. Vierock*, K. Oda*, S. Oishi*, S. Rodriguez-Rozada, R. Taniguchi, K. Yamashita, J.S. Wiegert, T. Nishizawa, P. Hegemann und O. Nureki. (2018) Redder than Chrimson: structure guided engineering of a red-shifted optogenetic actuator. *18th International Conference on Retinal Proteins*, Hockley Valley, Ontario, Kanada, **Kurzvortrag und Poster.**

J. Vierock*, K. Oda*, S. Oishi*, S. Rodriguez-Rozada, R. Taniguchi, K. Yamashita, J.S. Wiegert, T. Nishizawa, P. Hegemann und O. Nureki. (2018) Redder than Chrimson: structure guided engineering of a red-shifted optogenetic actuator. *Janelia Conference: Genetic Manipulation of Neuronal Activity V*, Ashburn, Virginia, Vereinigte Staaten von Amerika, **Poster.**

*Diese Autoren trugen gleichermaßen zu den entsprechenden Arbeiten bei.

INHALTSVERZEICHNIS

Zusammenfassung	1
Abstract	3
Danksagung	5
Veröffentlichungen und Vorträge	7
1 Einleitung	13
1.1 Mikrobielle Rhodopsine	13
1.2 Lichtabsorption mikrobieller Rhodopsine	15
1.3 Aktiver Protonentransport mikrobieller Rhodopsine	17
1.3.1 Der Photozyklus von Bacteriorhodopsin	18
1.3.2 Licht- und Dunkeladaptation von Bacteriorhodopsin	20
1.3.3 Diversität lichtgetriebener Protonenpumpen	22
1.3.4 Elektrophysiologische Untersuchungen von der Protonenpumpe zum Kanal	23
1.4 Passive Protonenleitung von Kanalrhodopsinen	24
1.4.1 Molekulare Struktur der Kanalrhodopsinchimäre C1C2	25
1.4.2 Der Kanalrhodopsinphotozyklus	27
1.4.3 Protonentransferreaktionen während des Photozyklus	29
1.4.4 Konformationelle Änderungen während der Kanalöffnung	30
1.4.5 Photozyklus und Lichtadaptation	31
1.4.6 Ionenleitfähigkeit und Selektivität von Kanalrhodopsinen	33
1.5 Prinzipien der Protonenleitung und Selektivität anderer Protonenkanäle	35
1.6 Optogenetik - Das Steuern und Beobachten von Zellen mit Licht	37
1.7 Die Kanalrhodopsine Chrimson und CsChR	38
2 Zielsetzung	41
3 Methoden	43
3.1 Molekularbiologische Methoden	43
3.1.1 Verwendete Gene und Plasmide	43
3.1.2 Vermehrung von Expressionsplasmiden in <i>E.coli</i>	43
3.1.3 Genetische Modifikation von Plasmid DNA	45
3.1.4 <i>In vitro</i> RNA-Synthese	47
3.2 Heterologe Expression von Membranproteinen	47
3.2.1 Heterologe Expression von Membranproteinen in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	48
3.2.2 Heterologe Expression von Membranproteinen in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK-Zellen)	48

3.2.3	Heterologe Expression von Membranproteinen in der Hefe <i>Pichia pastoris</i>	49
3.3	Elektrophysiologische Methoden	50
3.3.1	Vorbereitungen elektrophysiologischer Messungen	51
3.3.2	Experimenteller Aufbau	52
3.3.3	Durchführung der elektrophysiologischen Messungen	55
3.4	Bildgebende Verfahren	58
3.4.1	Organische und genetisch kodierte Kalzium- und Protonenindikatoren	58
3.4.2	Bildgebung intrazellulärer und lokaler Ca ²⁺ - und H ⁺ -Konzentrationsänderungen in HEK-Zellen	59
3.4.3	Konfokale Mikroskopie zur Bestimmung der Proteinlokalisierung	62
3.5	Proteinaufreinigung und Absorptionsspektroskopie	62
3.6	Datenauswertung und Darstellung	63
3.6.1	Elektrophysiologie	64
3.6.2	Konfokale Mikroskopie	67
3.6.3	Bildgebende Verfahren	67
3.6.4	Statistik	68
4	Ergebnisse	69
4.1	Protonenleitung in Kanalrhodopsinen	69
4.1.1	Diversität der Protonenselektivität von ChRs	69
4.1.2	Protonenleitfähigkeit und Änderung des intrazellulären pH-Wertes	71
4.2	Der rotlichtaktivierte Protonenkanal Chrimson	76
4.2.1	Chrimsonvarianten zur verbesserten Membranlokalisierung	76
4.2.2	pH-Abhängigkeit des Chrimsonphotostroms unter längerer Belichtung	77
4.2.3	Ionenselektivität von Chrimson	79
4.2.4	Molekulare Bestimmungsfaktoren der Ionenleitung von Chrimson	82
4.2.5	Die Retinalbindetasche von Chrimson	83
4.2.6	Der Gegenionkomplex von Chrimson	85
4.2.7	Die ionenleitende Pore von Chrimson	87
4.2.8	Helix-2-Glutaminsäuren in Chrimson	90
4.2.9	Molekulare Bestimmungsfaktoren der Protonenselektivität von Chrimson	93
4.2.10	pH-Abhängigkeit des Photozyklus von Chrimson	94
4.2.11	Lichtadaptation von Chrimson	96
4.2.12	Zeitliche Entwicklung des Photostroms der Chrimson-E4'A-Mutante	98
4.3	Der grünlichtaktivierte Protonenkanal CsChR	101
4.4	Aktiver und passiver Protonentransport der Protonenpumpe CsR	103
4.5	Protonenleitung im Photozyklus von CrChR2	105
4.5.1	Zeitliche Evolution der Protonenleitung in CrChR2	106
4.5.2	Zeitliche Evolution der Protonenleitung in CrChR2 E90Q	109
4.5.3	Molekulare Modulatoren der Photozykluskinetik in CrChR2	109
4.6	Zwei-Komponenten-Optogenetik	113

4.6.1	Kanalrhodopsin-Tandem-Konstrukte zur wellenlängenabhängigen Kontrolle der Ionenflüsse	113
4.6.2	Extrazelluläre pH-Wert-Änderung an der Membranoberfläche	117
4.6.3	Protonengekoppelte Zwei-Komponenten-Optogenetik	119
5	Diskussion	127
5.1	Molekulare Bestimmungsfaktoren der Rotlichtabsorption von Chrimson	127
5.1.1	Struktur und Protonierung des Gegenionkomplexes	127
5.1.2	Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerk und Elektrostatik der äußeren Pore	130
5.1.3	Polarität und Rigidität der Retinalbindetasche	131
5.1.4	Röter als Chrimson - S169 zwischen Gegenion und Retinalbindetasche .	132
5.2	Der Photozyklus von <i>CrChR2</i> - Leitende Zustände und Lichtadaptation	134
5.2.1	Leitende Zustände des dunkeladaptierten <i>CrChR2</i>	134
5.2.2	Lichtadaptation von <i>CrChR2</i>	135
5.2.3	E3'/E90 im Photozyklus von <i>CrChR2</i>	137
5.3	Der Photozyklus von Chrimson	138
5.3.1	pH-abhängige Dunkelzustände von Chrimson	138
5.3.2	pH-abhängige Photozyklen von Chrimson	140
5.3.3	Wellenlängenabhängige Lichtadaptation in Chrimson	142
5.3.4	Chrimson zeigt keine Dunkeladaptation	144
5.3.5	Ein langlebiges, UV-sensitives Photozyklusprodukt - der Q-Zustand von Chrimson?	145
5.4	Protonenleitung und Selektivität	146
5.4.1	Chrimson ist ein Protonenkanal	146
5.4.2	Intrazelluläre pH-Änderungen und Photostromänderungen	147
5.4.3	Ionenkompetition in Chrimson	149
5.4.4	Ein delokalisierte Protonenselektivitätsfilter	151
5.4.5	Protonenselektivität verschiedener Photozyklusintermediate	153
5.5	Die ionenleitende Pore von Chrimson	155
5.6	Molekulare Bestimmungsfaktoren der Photostromkinetik von Chrimson	157
5.6.1	Molekulare Bestimmungsfaktoren der Photostromkinetik entlang der Pore	158
5.6.2	Molekulare Bestimmungsfaktoren der Photostromkinetik in der Retinalbindetasche	161
5.7	Undichte Pumpen und transportierende Kanäle	163
5.7.1	Passive Protonenleitung von <i>CsR Y14E</i>	164
5.7.2	Auswärtsprotonentransport von <i>CrChR2 T159M</i>	164
5.7.3	Einwärtsprotonentransport von Chrimson <i>E4'A</i>	165
5.7.4	Kurzes Fazit zu Pump-Kanal-Mutanten	166
5.8	Optogenetische Werkzeuge erhöhter Spezifität	166
5.8.1	Chrimson und <i>CsChR</i>	167
5.8.2	ChrimsonS und ChrimsonSA	167

5.8.3	Zwei-Komponenten-Optogenetik: Fusionierte lichtaktivierte Ionenkanäle zur Aktivierung und Inhibition	169
5.8.4	Zwei-Komponenten-Optogenetik: Protonenpumpe und Kanal	170
5.9	Ausblick	173
A	Anhang	175
A.1	Ergänzende Abbildungen	175
A.2	Ergänzende Daten	180
A.3	Gerätelisten	186
A.4	Chemikalien, Materialien und Zellen	189
	Literaturverzeichnis	191
	Abkürzungsverzeichnis	229
	Abbildungsverzeichnis	232
	Tabellenverzeichnis	234
	Eigenständigkeitserklärung	235

1 EINLEITUNG

Licht ist von essentieller Bedeutung für das Leben auf unserer Erde. Es dient nicht nur als Energiequelle, sondern auch als Informationsträger. Einzelne Lichtquanten werden in spezialisierten Proteinkomplexen mit Hilfe eines Chromophors absorbiert. Die Lichtenergie kann anschließend von der Zelle oder ihren Organellen durch den Aufbau eines Protonengefälles entlang ihrer Oberfläche gespeichert werden. Alternativ können elektrische Signalprozesse durch die Öffnung selektiver Ionenkanäle in der Zellmembran ausgelöst werden, die es dem Organismus erlauben, sein Verhalten an die Richtung und Qualität des Lichtes anzupassen. Mikrobielle Rhodopsine stellen eine eigenständige Proteinfamilie dar, deren einzelne Vertreter beide Funktionen wahrnehmen können. Insbesondere Protonen können hierbei aktiv aus der Zelle transportiert oder passiv über die Zellmembran geleitet werden und entsprechend der Speicherung bzw. Wahrnehmung der Lichtenergie und Information dienen.

1.1 Mikrobielle Rhodopsine

Mikrobielle Rhodopsine sind membranständige Photorezeptoren aus in der Regel sieben Transmembranhelizes mit einem Retinal als Chromophor. Dieses ist kovalent über eine Schiff'sche Base an ein konserviertes Lysin in Helix 7 gebunden und liegt vorwiegend in der *all-trans*-Konfiguration vor [Ernst et al., 2014]. Mikrobielle Rhodopsine oder auch Typ-I Rhodopsine wurden bisher in Archaeen, Bakterien, Algen und Pilzen gefunden und unterscheiden sich trotz ähnlichem Aufbau in Funktion, Mechanismus und Sequenz von Typ-II Rhodopsinen höherer Tiere [Govorunova et al., 2017a]. Einzelne mikrobielle Rhodopsine können entsprechend ihrer molekularen Funktion in lichtgetriebene Iontentransporter, lichtaktivierte Ionenkanäle und lichtregulierte Signaltransduktoren unterschieden werden (Abb. 1.1) [Govorunova et al., 2017a, Zhang et al., 2011].

Iontentransporter bzw. Ionenpumpen befördern für jedes absorbierte Photon ein geladenes Teilchen in festgelegter Richtung über die Membran (Abb. 1.1 links). Von besonderer Bedeutung sind auswärtsgerichtete Protonenpumpen mit Bacteriorhodopsin (BR) als bekanntesten Vertreter. Dieses wurde als erstes mikrobielles Rhodopsin vor fast fünfzig Jahren in der Purpurmembraan des Archaeon *Halobacterium salinarum* identifiziert [Oesterhelt and Stoeckenius, 1971] und seitdem in zahlreichen Studien detailliert untersucht [Ernst et al., 2014, Lanyi, 2004]. Weitere Ionenpumpen transportieren nach Lichtabsorption Natriumionen [Inoue et al., 2013] aus der Zelle heraus oder Chloridionen [Schobert and Lanyi, 1982] in die Zelle hinein. Erst vor kurzem wurden auch einwärtsgerichtete Protonenpumpen [Inoue et al., 2016] und als besonders exotischer Fall sogar eine einwärtsgerichtete Sulfatpumpe beschrieben [Niho et al., 2017]. Auswärtsgerichtete Protonenpumpen tragen aktiv zur Energiegewinnung der Zelle bei [Danon and Stoeckenius, 1974] und finden ökologisch weite Verbreitung [Béjà et al., 2001, Pinhassi et al., 2016]. Im Picoplankton der

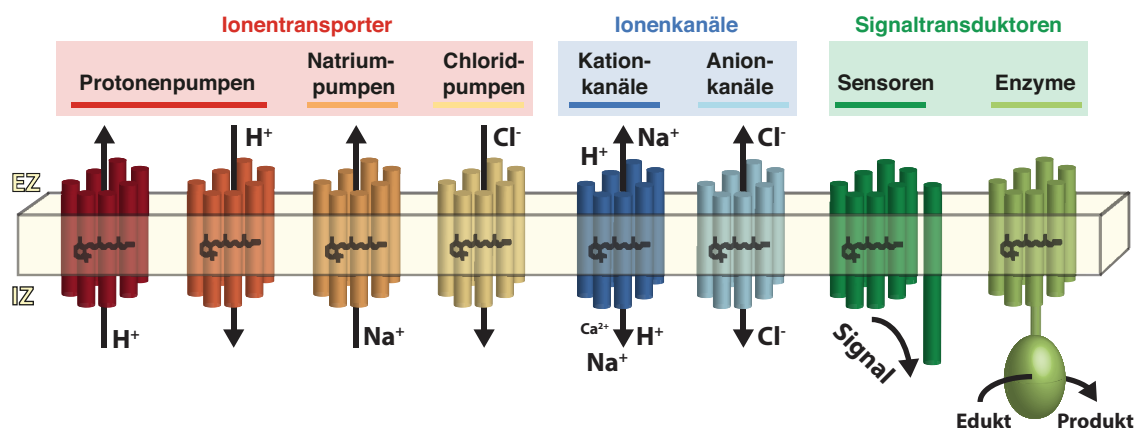


Abbildung 1.1: Funktionen mikrobieller Rhodopsine: 1. Auswärtsgerichtete Protonenpumpe (z.B. Bacteriorhodopsin (BR) aus dem Archaeon *Halobacterium salinarum* [Oesterhelt and Stoeckenius, 1971]), 2. Einwärtsgerichtete Protonenpumpen (z.B. *P. oceani* Xenorhodopsin (PoXeR) aus dem marinen Bakterium *Parvularcula oceani* [Inoue et al., 2016]) 3. Auswärtsgerichtete Natriumpumpen (z.B. *Krokinobacter* Rhodopsin 2 (KR2) aus dem marinen Flavobakterium *Krokinobacter eikastus* [Inoue et al., 2013]) 4. Einwärtsgerichtete Chloridpumpen (z.B. Halorhodopsin (HR) aus dem Archaeon *Halobacterium salinarum* [Schobert and Lanyi, 1982]) 5. Kationenleitende Kanalrhodopsine (z.B. Kanalrhodopsin-2 (CrChR2) aus der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* [Nagel et al., 2003]). 6. Anionenleitende Kanalrhodopsine (z.B. Anion-Conducting-Channelrhodopsin 1 (GtACR1) aus der Cryptophyten Alge *Guillardia theta* [Govorunova et al., 2015]), 7. Signaltransduzierende bzw. sensorische Rhodopsine (z.B. Sensory Rhodopsin 1 (SRI) aus dem Archaeon *Halobacterium salinarum* [Bogomolni and Spudich, 1982, Yao and Spudich, 1992]). 8. Enzymrhodopsine (z.B. die Rhodopsin Guanylylzyklase (RhGC) aus dem Pilz *Blastocladiella emersonii* [Avelar et al., 2014]). EZ steht für extrazellulär und IZ für intrazellulär.

Ozeane ist die Energieerschließung durch lichtgetriebene Protonenpumpen ähnlich hoch wie der menschliche Verbrauch fossiler Energiequellen [Govorunova et al., 2017a].

In lichtaktivierten Ionenkanälen oder Kanalrhodopsinen (ChRs) führt die Absorption von Licht zur Ausbildung einer ionenleitenden Pore, durch welche unterschiedliche Ladungsträger entsprechend ihres elektrochemischen Gradienten in unterschiedlicher Richtung geleitet werden [Nagel et al., 2002] (Abb. 1.1 Mitte). Während ChRs in Cryptophyten-Algen mariner Gewässer vorwiegend monovalente Anionen [Govorunova et al., 2015, 2016a, 2017b, Wietek et al., 2016] oder Kationen [Govorunova et al., 2016b, Yamauchi et al., 2017] leiten, zeichnen sich ChRs aus den auch in salzärmeren Gewässern und feuchten Böden vorkommenden Chlorophyten-Algen durch eine hohe Protonen- und reduzierte Kationleitfähigkeit aus [Hou et al., 2012, Nagel et al., 2002, Schneider et al., 2015, Vierock et al., 2017, Zhang et al., 2011]. Eine effiziente Protonenleitung ermöglicht Einwärtsströme auch bei niedriger extrazellulärer Ionenstärke, wohingegen die verbleibende Kationleitfähigkeit Einwärtsströme bei sich ändernden extrazellulären pH-Werten gewährleistet [Taylor et al., 2012]. In der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* sind die Kanäle CrChR1 und CrChR2 im Augenfleck der Alge lokalisiert und kontrollieren von dort den Kalziumeinstrom in den Flagellen [Berthold et al., 2008, Foster et al., 1984, Harz and Hegemann, 1991, Sineshchikov et al., 2002]. Je nach Lichtbedingung kann das Schlagmuster der Flagellen geändert werden und die Alge ihren Aufenthaltsort anpassen.

In lichtaktivierten Signaltransduktoren aktiviert eine Konformationsänderung des Rhodopsins ein

membranständiges [Yao and Spudich, 1992] oder zytoplasmatisches [Jung et al., 2003] Signalprotein oder reguliert eine zytoplasmatisch gekoppelten Enzymdomäne [Avelar et al., 2014, Luck et al., 2012, Scheib et al., 2015, Tian et al., 2018, Yoshida et al., 2017] (Abb. 1.1 rechts). Erneut im *Halobacterium salinarum* kontrollieren die sensorischen Rhodopsine SRI und SRII über ihre signaltransduzierenden Proteine HTR1 und HTR2 eine Signalkaskade, welche durch die Regulierung der Rotationswechselfrequenz des Flagellenmotors die Phototaxis des Archaeons bestimmt [Hoff et al., 1997]. Pilzsporen von *Blastocladiella emersonii* ändern ihren Geißelschlag hingegen nach Öffnung eines cGMP-aktivierten Kaliumkanals als Antwort auf Änderungen der intrazellulären cGMP-Konzentration durch eine lichtaktivierte Rhodopsinzyklase [Avelar et al., 2014, 2015]. Das sensorische Rhodopsin ASR aus dem Süßwassercyanobakterium *Anabaena Nostoc* reguliert hingegen gemeinsam mit einem zytosolischen Effektorprotein, welches als Transkriptionsfaktor wirkt, die Genexpression von Photopigmenten und Proteinen der molekularen Uhr [Irieda et al., 2012, Kim et al., 2014].

In einzelnen Fällen kann sich die Funktion eines Rhodopsins je nach Proteinumgebung ändern oder ist noch nicht vollständig geklärt. Entsprechend wird für das sensorische Rhodopsin SRI eine Protonenpumpaktivität beobachtet, wenn es ohne sein signaltransduzierendes Protein HTR1 exprimiert wird [Bogomolni et al., 1994]. In cyano- und proteobakteriellen Protonenpumpen kommt es bei niedrigen extrazellulären pH-Werten zu einer Inversion der Protonenstromrichtung, was sowohl auf eine zusätzliche passive Protonenleitung [Vogt et al., 2013] als auch auf eine Änderung der Protonentransportrichtung zurückgeführt werden könnte [Friedrich et al., 2002]. Auch für die ChRs CrChR1 und CrChR2 wurde im Augenfleck der Alge *Chlamydomonas reinhardtii* eine Photorezeptorstromkomponente erhöhter Lichtsensitivität und langsamer Kinetik beobachtet, welche auf eine zusätzlich sensorischen Funktion zur indirekten Öffnung assoziierter Ionenkanäle hindeutet [Braun and Hegemann, 1999b, Ehlenbeck et al., 2002, Sineshchekov and Spudich, 2005].

1.2 Lichtabsorption mikrobieller Rhodopsine

Aktiviert werden mikrobielle Rhodopsine durch die Absorption von Licht einer bestimmten Wellenlänge. Im Grundzustand befindet sich das Retinal in der Regel in einer all-*trans*-Konfiguration und die Retinal-Schiff-Base (RSB) ist protoniert (RSBH^+) [Ernst et al., 2014]¹. Die Protonierung der RSBH^+ ist entscheidend für die Absorption von sichtbarem Licht (400 nm - 700 nm). Entsprechend ist das Absorptionsmaximum der protonierten RSBH^+ sowohl im Vakuum als auch in organischem Lösungsmittel im Vergleich zum deprotonierten Chromophor deutlich rotverschoben (610 nm zu 487 nm im Vakuum und 444 nm zu 390 nm in Methanol) [Andersen et al., 2005]. Die Protonierung der RSBH^+ wird durch ein negativ geladenes Gegenion stabilisiert, welches den pK_a -Wert - sprich jenen pH-Wert, bei dem protonierte RSBH^+ und deprotonierte RSB mit glei-

¹Interessante Ausnahmen dieser Grundzustandskonfiguration finden sich im photochromen Farbsensor ASR sowie in der bistabilen Rhodopsinhistidinkinase HKR1 aus *Chlamydomonas reinhardtii*. In beiden Proteinen hängt die Chromophorkonfiguration von der vorangegangenen Belichtung ab und umfasst eine 13-*cis*-Form als blauverschobenen Grundzustand [Luck et al., 2012, Vogeley et al., 2004]. Für HKR1 ist die RSB im 13-*cis*-Grundzustand zusätzlich deprotoniert und absorbiert im ultravioletten Lichtbereich.

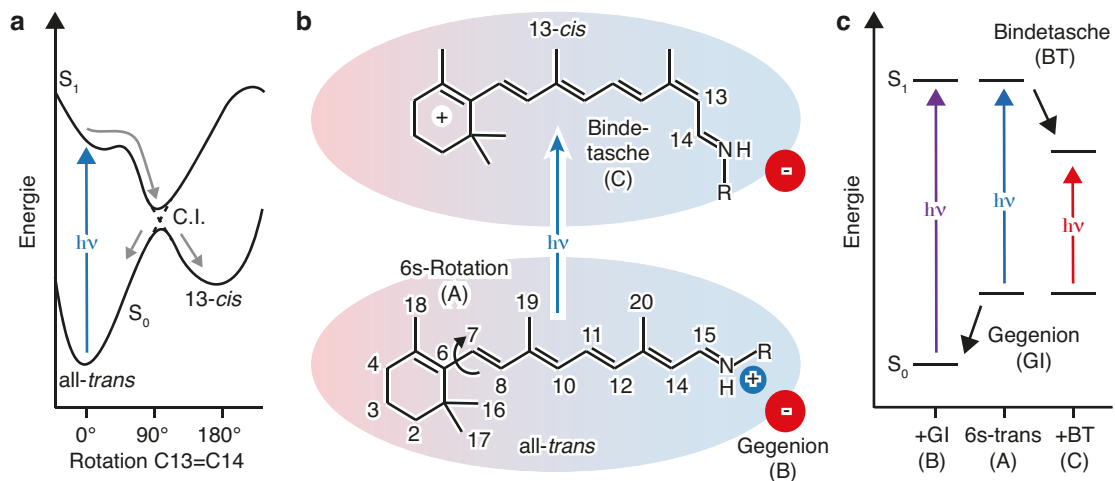


Abbildung 1.2: Lichtabsorption mikrobieller Rhodopsine (a) Skizzierte Potentialflächen entlang der Reaktionskoordinate der C13=C14-Bindung während der all-*trans*→13-*cis*-Isomerisierung in BR. Nach Anregung durch Licht in den Franck-Condon-Zustand und anschließenden Torsion der C13=C14-Bindung im angeregten Zustand S₁ relaxiert das Molekül über eine konische Überschneidung (Conical intersection C.I.) in den Grundzustand S₀ in einer cisoiden Konfiguration [Kobayashi et al., 2001]. (b) Schematische Darstellung der all-*trans*→13-*cis* Isomerisierung sowie Verschiebung der Ladungsverteilung des Retinals im angeregten Zustand unter Berücksichtigung externer Faktoren: (A) Torsion der 6s-Bindung (B) Gegenion der protonierten RSBH⁺ (C) Polarität und Polarisierbarkeit der Retinalbindetasche. (c) Einfluss der unterschiedlichen Faktoren (A)-(C) auf die Anregungsenergie [Ernst et al., 2014].

cher Wahrscheinlichkeit auftreten - deutlich anhebt [Ebrey, 2000, Luecke et al., 1998, Marti et al., 1991].

Die Lichtabsorption führt zur Anregung des delokalisierten Elektronensystems des Retinals und induziert einen $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang [Salem and Bruckmann, 1975] (Abb. 1.2 a). Im angeregten Zustand wird die positive Ladung vom Stickstoff der RSBH⁺ über die Polyenkette delocalisiert und in Richtung des β -Iononringes verschoben [Song et al., 1993]. Als Folge der Ladungsumverteilung werden sukzessiv die Bindungslängen und Torsionswinkel des Retinals energetisch angepasst [Ernst et al., 2014], wobei die Rotation um einzelne Bindungen zur konischen Überschneidung der Potentialflächen von angeregtem Zustand und Grundzustand führt und schließlich in der Isomerisierung des Chromophors mündet - in mikrobiellen Rhodopsinen vorwiegend um die C13=C14-Bindung [Altoè et al., 2010] (Abb. 1.2 b). Die energetischen Anforderung der Lichtabsorption sowie die Geschwindigkeit und Effizienz (Quantenausbeute) der all-*trans*→13-*cis*-Isomerisierung werden durch die Proteinumgebung bestimmt, welche gleichzeitig alternative Photoprodukte - wie sie nach Anregung der RSBH⁺ in Lösung beobachtet werden - verhindert [Hamm et al., 1996].

Der Einfluss der Proteinumgebung auf die unterschiedlichen Energieniveaus der RSBH⁺ spiegelt sich in der spektralen Vielfalt mikrobieller Rhodopsine wider, mit maximalen Anregungswellenlängen von 436 nm [Schneider et al., 2015] bis 594 nm [Chow et al., 2010]. Anregungsenergie und Anregungswellenlänge verhalten sich hierbei invers proportional zueinander und die Differenz der Anregungswellenlängen des gebundenen und isolierten Chromophors wird als Opsinverschiebung bezeichnet [Nakanishi et al., 1980]. Bestimmt wird die Anregungswellenlänge durch die Ausdehnung des konjugierten π -Elektronensystems (A) sowie die unterschiedliche Stabilisierung

des Grund- (B) und angeregten Zustandes (C) durch die Proteinumgebung [Wang et al., 2014] (Abb. 1.2 b und c). Eine effiziente Kopplung des konjugierten π -Elektronensystems wird durch eine planare Retinalkonfiguration begünstigt und kann durch eine Verdrehung der C6-C7 Bindung gestört werden (A). Im Vakuum befinden sich sowohl *6s-trans*- als auch das um 80 nm blauverschobene *6s-cis*-Retinal im Gleichgewicht miteinander [Rajput et al., 2010], wohingegen in der Retinalbindetasche mikrobieller Rhodopsine eine planare *6s-trans*-Konfiguration des Retinals stabilisiert wird [Harbison et al., 1985]. Der Grundzustand wird durch die elektrostatische Wechselwirkung der RSBH⁺ mit dem negativ geladenen Gegenion stabilisiert (B) [Blatz et al., 1972]. Die Ladungsverschiebung im angeregten Zustand kann hingegen durch die Verteilung polarisierbarer, aromatischer Aminosäure entlang der Polyenkette [Houjou et al., 2001] sowie polarer Reste in der Umgebung des β -Iononringes gefördert werden (C) [Kloppmann et al., 2005]. In einem Modellsystem, basierend auf dem löslichen Retinolbindungsprotein II, erwies sich weiterhin die vollständige Abschirmung des Retinals vom äußeren Lösungsmittel als wichtig und erlaubte eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 425 nm zu 644 nm durch den Austausch weniger Aminosäuren [Wang et al., 2012].

1.3 Aktiver Protonentransport mikrobieller Rhodopsine

Der lichtgetriebene Protonentransport mikrobieller Rhodopsine erfolgt in einer zyklischen Abfolge von Konformationsänderungen, welche durch Protonenaffinitätsänderungen und die alternative Zugänglichkeit der zentralen Protonenbindestelle der RSBH⁺ eine zeitlich separierte Protonenabgabe an das extrazelluläre Medium und Protonenaufnahme aus dem Zytoplasma ermöglichen (Abb. 1.3 a) [Fodor et al., 1988, Lanyi, 1995]. Der molekular Ablauf des auswärtsgerichteten Protonentransportes ist insbesondere für BR im Detail untersucht und wurde in zahlreichen Übersichtsartikeln zusammengefasst [Ernst et al., 2014, Gerwert et al., 2014, Heberle, 2000, Kandori, 2015, Lanyi, 2004]. Die Struktur von BR konnte bereits 1975 elektronenmikroskopisch mit niedriger Auflösung aufgeklärt werden [Henderson and Unwin, 1975] und seit 1979 ist auch die Aminosäuresequenz von BR bekannt [Khorana et al., 1979]. Obwohl BR in der Purpirmembran des Halobacterium als Trimer vorliegt, ist das Monomer selbst für den Protonentransport verantwortlich [Dencher and Heyn, 1979]. Allgemein können nach Belichtung Absorptionsänderungen des Retinals einzelnen Reaktionsschritten zugeordnet und in einem Photozyklus zusammengefasst werden (Abb. 1.3 b) [Lanyi and Váró, 1995]. Ein zyklischer Ablauf ist hierbei physiologisch notwendig, um durch wiederholte Aktivierung der Protonenpumpe einen Protonengradienten aufbauen zu können. Raman- und Infrarotspektroskopie erlaubten es, Protonierungs- und Retinalkonfigurationsänderungen einzelnen Photozyklusübergängen zuzuordnen [Heberle et al., 2000]. Die räumliche Struktur vieler Photointermediate konnte bei niedrigeren Temperaturen und durch verschiedene Mutanten stabilisiert und kristallografisch gelöst werden [Lanyi, 2004]. Erst vor Kurzem wurde die genaue zeitliche Abfolge früherer Reaktionsschritte durch zeitaufgelöste kristallographische Messungen mit einem Freien-Elektronenlaser bei Raumtemperatur bestätigt [Nango et al., 2016, Nogly et al., 2018].

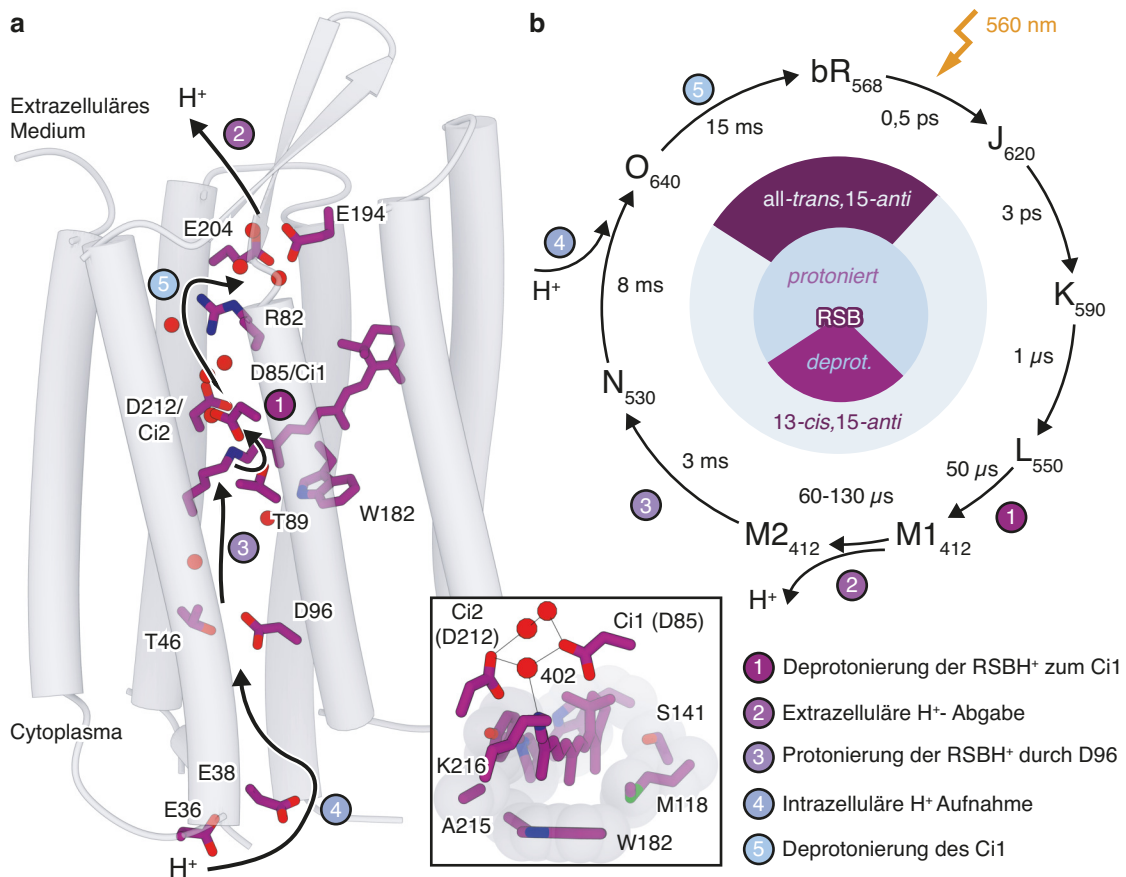


Abbildung 1.3: Photozyklus und Protonentransferschritte der Protonenpumpe Bacteriorhodopsin
(a) Protonentransportweg vom Zytosplasma zum extrazellulären Medium sowie wichtige beteiligte Aminosäuren und fixierte Wasser, skizziert und entsprechend ihrer Reihenfolge nummeriert in der Dunkelstruktur des lichtadaptierten BR, aufgelöst bei 1,5 Å (PDB: 1c3w) [Luecke et al., 1999b]. Einschub: Ausschnitt der Retinalbindetasche mit dem pentagonalem H-Brückennetzwerk des Gegenionkomplexes sowie den für die FarbabSORption wichtigen Aminosäuren. **(b)** Photozyklus von BR mit den bei Raumtemperatur zu beobachtenden Zeitkonstanten nach Heberle et al. [Heberle et al., 2000] und modifiziert bezüglich des M1→M2 Überganges entsprechend der Zeitkonstante der Protonenabgabe an der extrazellulären Proteinoberfläche [Cao et al., 1995, Heberle and Dencher, 1992].

1.3.1 Der Photozyklus von Bacteriorhodopsin

Im Grundzustand von BR wird die protonierte RSBH⁺ durch ein komplexes Gegenion aus den beiden deprotonierten Carbonsäuren D85 in Helix 3 (Ci1 für „Counter ion 1“ (engl.)) und D212 in Helix 7 (Ci2 für „Counter ion 2“ (engl.))² stabilisiert. Diese bilden ein pentamerer Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerk und interagieren mit der RSBH⁺ über das Wasser W402 (Abb. 1.3 a Einschub) [Luecke et al., 1999b]. Die Lichtabsorption des BR₅₆₈-Zustandes führt zu einer Ladungsverschiebung im all-trans,15-anti-Chromophor von der RSBH⁺ zum β-Iononring und einer ultraschnellen Verschiebung des konjugierten Wassers W402 [Nogly et al., 2018]. Gleichzeitig kann die zunehmende Rotation der C13=C14-Bindung in der räumlich begrenzten Retinalbindetasche durch eine gegenläufige Torsion benachbarter Bindungen vorübergehend ausgeglichen werden,

²Die Abkürzungen Ci1 und Ci2 werden proteinübergreifend für Reste an den homologen Gegenionpositionen im Folgenden auch für weitere Proteine verwendet.

bevor sie dank der Wasserstoffbrückenbindung von RSBH⁺ und W402 zur 13-*cis*-Isomerisierung aufgelöst werden kann (beschrieben als „aborted bicycle-pedal model“ (engl.)) [Altoè et al., 2010, Nogly et al., 2018]. Die all-*trans*→13-*cis*-Isomerisierung erfolgt innerhalb von 500 fs [Herbst et al., 2002] in den schwingungsaktiven J-Zustand [Doig et al., 1991] und ist nach 3 ps im rotverschobenen K-Intermediat abgeschlossen [Heberle et al., 2000]. Die Proteinumgebung kann in dieser kurzen Zeitspanne der Konformationsänderung des isomerisierten Chromophor nur bedingt folgen und hält das Retinal in einer verdrehten Konfiguration [Bullough and Henderson, 1999, Edman et al., 1999, Matsui et al., 2002]. Sowohl die Retinaldistortion als auch das umstrukturierte Wasserstoffbrückennetzwerks der RSBH⁺ speichern die für den weiteren Photozyklus benötigte Energie [Ernst et al., 2014, Hayashi et al., 2002].

Der erster Protonentransfer des Photozyklus von BR erfolgt bei Raumtemperatur erst 50 µs nach Anregung und verläuft von der RSBH⁺ zum Gegenion Ci1 (Abb. 1.3 Schritt (1)) [Gerwert et al., 1990]. Im L→M-Übergang führt dies zu einer deutlichen Blauverschiebung der Proteinabsorption [Lewis et al., 1974]. Im Dunkelzustand unterscheiden sich die pK_a-Werte des Ci1 und der RSBH⁺ um fast zehn Größenordnungen und müssen für den primären Protonentransfer erst angeglichen werden [Rouso et al., 1995, Sheves et al., 1986, Subramaniam et al., 1990]. Auf der extrazellulären Seite der RSBH⁺ bewirkt hierfür die Delokalisation des Wassers W402 eine Umstrukturierung des extrazellulären Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerkes und eine Annäherung von Helix 3 und 7 [Nango et al., 2016, Royant et al., 2000]. Gleichzeitig formt sich auf der zytoplasmatischen Seite der RSBH⁺ durch die transiente Fixierung eines zusätzlichen Wassers eine Wasserstoffbrückenbindungskette zwischen der RSBH⁺, T89 und dem Protonenakzeptor Ci1 [Kouyama et al., 2004, Nango et al., 2016], welche nach theoretischen Berechnungen einen energetisch günstigen Protonentransferweg darstellt [Bondar et al., 2008] und nach Angleichung der pK_a-Werte von RSBH⁺ und Ci1 vermutlich den primären Protonentransfer ermöglicht.

Unmittelbar nach der Protonierung des Ci1 resultiert die veränderte Ladung des Gegenions in einer Auswärtsbewegung des benachbarten positiv geladenen R82 in Richtung der extrazellulären Glutaminsäuren E194 und E204 [Luecke et al., 1999a, Nango et al., 2016, Scharnagl et al., 1995]. Beide Glutaminsäuren stabilisieren zusammen mit konjugierten Wassermolekülen ein delokalisiertes Proton [Rammelsberg et al., 1998], welches bei neutralem pH-Wert fast zeitgleich zur Deprotonierung der RSBH⁺ an das extrazelluläre Medium abgegeben wird (Abb. 1.3 Schritt (2)) [Drachev et al., 1984, Heberle and Dencher, 1992]. Nach Protonenabgabe wird R82 durch die deprotonierte Protonenabgabegruppe in einer Auswärtsorientierung stabilisiert und die Protonenaffinität des primären Protonenakzeptors Ci1 bleibt hoch [Lórenz-Fonfría and Kandori, 2009]. Gleichzeitig bricht die Wasserstoffbrückenbindung zwischen Ci1 und T89 auf und das konjugierte Wasser delokalisiert, wodurch sich der ursprüngliche Protonentransferweg auflöst [Nango et al., 2016]. Im spektroskopisch kaum sichtbaren M1→M2 Übergang ändert sich entsprechend nicht nur die Protonenaffinität des Gegenions sondern auch die Zugänglichkeit der RSB, was eine Reprotonierung der RSBH⁺ durch das Ci1 verhindert und den aktiven Protonentransport ermöglicht [Lanyi, 2004].

Die Reprotonierung der RSB erfolgt stattdessen von zytoplasmatischer Seite durch das 10-12 Å entfernte D96 (Abb. 1.3 Schritt (3)). Der entsprechende M2→N-Übergang kann durch eine erneu-

te Rotverschiebung der Proteinabsorption beobachtet werden [Gerwert et al., 1989, Holz et al., 1989]. Der Protonentransfer von D96 zur RSB erfolgt über einen transient ausgebildeten intrazellulären Halbkanal, dessen Öffnung die größte Strukturänderung des BR-Photozyklus darstellt [Souvignier and Gerwert, 1992]. Eingeleitet wird die Öffnung des Halbkanals durch eine räumliche Verschiebung des W182 in der Retinalbindetasche durch die C13-Methylgruppe des deprotonierten und nun vollständig relaxierten Chromophors sowie durch Wasserstoffbrückenbindungsänderungen des Helix 7 Rückgrates nahe der Schiffbasenbindung [Lanyi, 2004, Nango et al., 2016]. Strukturelle Änderungen werden in Richtung des Zytoplasmas propagiert und führen zu einem Auseinanderklappen von Helix 6 und 7 und dem Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindung von D96 und T46 durch ein interkaliertes Wasser [Luecke et al., 2000]. Die hydrophilere Umgebung erniedrigt den pK_a -Wert des Protonendonors und erlaubt die Reprotonierung der $RSBH^+$ [Brown et al., 1994, Zscherp et al., 1999] über eine Kette von wenigstens drei Wassermolekülen nach einem Grotthuß-Mechanismus [Freier et al., 2011]. Die Deprotonierung von D96 führt wiederum selbst zur Öffnung eines weiteren zytoplasmatischen Hydratisierungskanals [Wang et al., 2013], durch welchen - unterstützt durch geladene Reste auf der zytoplasmatischen Proteinoberfläche als Protonenantennen - die Reprotonierung des Protonendonors erfolgt (Abb. 1.3 Schritt (4)) [Checover et al., 1997, Schätzler et al., 2003]. Auch für die Protonenaufnahme wird ein transient delokalisiertes Proton diskutiert [Lorenz-Fonfria et al., 2017].

Die Rückisomerisierung des Chromophors in die *all-trans* Konfiguration erfolgt im $N \rightarrow O$ Übergang [Fodor et al., 1988] fast gleichzeitig zur Reprotonierung von D96 und beide Ereignisse könnten über die sie verbindende Wasserkette des intrazellulären Halbkanals direkt gekoppelt sein [Lanyi, 2004]. Aufgrund des im O-Zustand weiterhin protonierten Ci1 und einer verdrillten Retinalkonfiguration ist die Absorption des neu gebildeten *all-trans* Chromophors verglichen zum Dunkelzustand deutlich rotverschoben [Richter et al., 1996]. Als letzter Reaktionsschritt des Photozyklus deprotoniert das Ci1 [Bousché et al., 1992] und gibt sein Proton in einem wenig verstandenen Prozess - möglicherweise über das Ci2 oder R82- an die Protonenabgabegruppe oder - bei niedrigem pH-Wert - direkt an das extrazelluläre Medium ab (Abb. 1.3 Schritt (5)) [Dioumaev et al., 1999, Zscherp et al., 2001].

1.3.2 Licht- und Dunkeladaptation von Bacteriorhodopsin

In längeren Dunkelperioden ist die *all-trans,15-anti*-Konfiguration des Retinals nicht stabil und isomerisiert thermisch zur *13-cis,15-syn*-Form [Harbison et al., 1984]. Innerhalb von Minuten bis Stunden - beschleunigt durch höhere Temperaturen und einen niedrigen pH-Wert [Ohno et al., 1977] - stellt sich ein Gleichgewicht beider Isomere von 2:1 ein (*13-cis,15-syn:all-trans,15-anti*) [Scherrer et al., 1989]. Die Absorption des *13-cis,15-syn*-Zustandes (548 nm in BR_{548}) ist im Vergleich zum *all-trans,15-anti*-Chromophor (568 nm in BR_{568}) blau verschoben [Sperling et al., 1977]. Unterschiede der Proteinstruktur vor und nach Lichtadaptation sind klein und vorwiegend auf die direkte Umgebung der $RSBH^+$ und den extrazellulären Halbkanal beschränkt [Dencher et al., 1990, Nishikawa et al., 2005]. Hier führt die *13-cis,15-syn*-Isomerisierung zu Verschiebungen der Seitenketten von D85 (Ci1), T89, L93 und angrenzenden Wassermolekülen sowie zu

einem Auswärtsklappen des R82. Die pH-Abhängigkeit der Dunkeladaptationskinetik wird interessanterweise durch die Mutation R82A verschoben und offenbart eine Beschleunigung der Dunkeladaptation nach Protonierung des Ci1, welches protoniert einer thermischen Isomerisierung weniger im Weg steht [Balashov et al., 1993].

Beide Grundzustände von BR sind photoaktiv und initiieren nach Lichtabsorption unterschiedliche Photozyklen - den oben beschriebenen *anti*-Zyklus sowie den weniger gut verstandenen *syn*-Zyklus. Auch der *syn*-Zyklus umfasst mit einem kurzlebigen K-ähnlichen und einem langlebigen O-ähnlichen Zustand wenigstens zwei Photozyklusintermediate [Gergely et al., 1994, Hofrichter et al., 1989]. Eine Deprotonierung der RSBH⁺ sowie ein aktiver Protonentransport erfolgen im *syn*-Zyklus jedoch ausschließlich bei alkalischem pH-Wert [Drachev et al., 1988, 1993]. Nach Anregung des BR₅₄₈ verzweigt der *syn*-Zyklus mit geringer Wahrscheinlichkeit in den all-*trans*,15-*anti*-Dunkelzustand, wohingegen der *anti*-Zyklus keine entgegengesetzte Verzweigungsreaktion fördert. Innerhalb von hundert Belichtungszyklen kommt es dadurch zu einer mehr als 98%-igen Anreicherung des auch bei neutralem pH-Wert protonenpumpenden BR₅₆₈-Zustandes, was als Lichtadaptation bezeichnet wird. Der Photozyklusverzweigungszeitpunkt scheint hierbei lichtintensitätsabhängig sowohl früh als auch spät im *syn*-Photozyklus erfolgen zu können [Bryl et al., 1992].

Bei hoher Belichtungsintensität kommt es auch im *anti*-Zyklus zu einer Verzweigungsreaktion. Nach Absorption eines (zweiten) Photons durch den O-Zustand wird ein blauverschobenes P-Photointermediat mit 9-*cis*-Retinal als Chromophor gebildet, welches langsam in ein thermisch stabiles UV-absorbierendes Q-Intermediat mit ungebundenem, aber weiterhin in der Retinalbinde tasche eingeschlossenem 9-*cis*-Retinal übergeht [Popp et al., 1993]. Nach Popp et al. könnte vor allem die Protonierung des Ci1 im O-Zustand die alternative Isomerisierung begünstigen. Entsprechend wurden Intermediate mit gebundenem und hydrolysierten 9-*cis*-Retinal als zusätzliche Photoprodukte auch nach roter Belichtung der sogenannten „Blauen Membran“ beobachtet [Fischer et al., 1981]. Die „Blaue Membran“ stellt hierbei die Purpurmembra n des *Halobacterium salinarum* bei saurem pH-Wert dar [Oesterhelt and Stoeckenius, 1971], in welcher die Protonierung von Ci1 zu einer bathochromen Verschiebung der BR-Absorption zu 605 nm führt [Subramaniam et al., 1990]. Durch das Verfahren der gerichteten Evolution wurde die BR-Doppelmutante D85E/D96Q gefunden, in welcher durch Mutationen des primären Protonenakzeptors und -donors der pK_a-Wert des Purpur-zu-Blau-Überganges auf 9,7 angehoben wurde und in hydrierten Polyacrylamidgelen eine 99%-ige Akkumulation des Q-Zustandes beobachtet wird [Ranaghan et al., 2014]. Aufgrund der hydrolysierten Retinalbindung ist der Q-Zustand über Jahre stabil [Gillespie et al., 2002], kann jedoch genau wie der P-Zustand durch blaues Licht photochemisch in den BR-Dunkelzustand zurück überführt werden [Dancsházy and Tokaji, 2000]. In bioelektronischen Anwendungen werden die bistabilen Dunkelzustände von BR zur Informationsspeicherung verwendet [Li et al., 2018].

1.3.3 Diversität lichtgetriebener Protonenpumpen

In den letzten 20 Jahren konnten durch die Erschließung neuer genetischer Sequenzen aus unterschiedlichen Gewässerproben oder verschiedenen Organismen eine Vielzahl weiterer mikrobieller Protonenpumpen in Archaeen [Sharma et al., 2007], Bakterien [Béjà et al., 2000, Sharma et al., 2008], Pilzen [García-Martínez et al., 2015] und Algen [Janke et al., 2013, Tsunoda et al., 2006] identifiziert werden. Eine Kuriosität stellen hierbei die sogenannten Xanthorhodopsine dar, welche ein zusätzliches Carotinoid als Lichtantenne binden [Balashov et al., 2005].

In allen auswärtsgerichteten Protonenpumpen ist das Ci1 als primärer Protonenakzeptor konserviert und interagiert wie in BR über ein Wasser mit der RSBH⁺. Gleichzeitig bildet das Ci1 in vielen eubakteriellen Protonenpumpen wie Proteorhodopsin [Hempelmann et al., 2011], Xanthorhodopsin [Luecke et al., 2008] und ESR aus dem Permafrostbakterium *Exiguobacterium sibiricum* [Gushchin et al., 2013] eine Wasserstoffbrückenbindung mit einem Histidin in Helix 2, welche den pK_a-Wert des Gegenions moduliert. Interessanterweise scheint der Histidin-Asparaginsäure-Cluster in ESR den pK_a des Gegenions abzusenken [Balashov et al., 2012], jedoch in Proteorhodopsin auf einen pK_a von 7,5 anzuheben [Bergo et al., 2009, Friedrich et al., 2002, Hempelmann et al., 2011], wobei unterschiedliche Orientierungen des Histidins für die gegensätzliche Wirkung von Bedeutung zu sein scheinen [Bamann et al., 2014].

Auch an der Position des Protonendonors im intrazellulären Halbkanal unterscheiden sich einige Protonenpumpen erheblich. In Proteorhodopsinen [Béjà et al., 2000] und Xanthorhodopsinen [Balashov et al., 2005] befindet sich an der Position von D96 aus BR eine Glutaminsäure, in ESR ein Lysin und in PspR und PaR aus *Pseudomonas putida* und *Pantoea ananatis* sogar ein Glycin [Harris et al., 2015]. Während das Glycin selbst nicht mehr als Protonendonor fungieren kann, wurde von Harris et al. [2015] ein Protonendonorkomplex um ein benachbartes Histidin in Helix 2 vorgeschlagen, wohingegen Sudo and Yoshizawa [2016] eine direkte Reprotonierung der RSB aus dem intrazellulären Medium vermuten. Zur ersten funktionalen Unterscheidung verschiedener Ionenpumpen wurde eine Dreibuchstabenfolge entsprechend der am Protonentransfer in BR beteiligten Position D85, T89 und D96 vorgeschlagen [Beja and Lanyi, 2014]. Die unterschiedlichen Protonenpumpen entsprechen somit einem DTX-Motiv³ und unterscheiden sich von Natriumpumpen mit einem NDQ-Motiv oder Chloridpumpen mit einem NTQ oder TSA-Motiv.

Unter ursprünglich als Xenorhodopsin klassifizierten Sequenzen konnten vor kurzem auch lichtgetriebene einwärtsgerichtete Protonenpumpen identifiziert werden. Sowohl PoXeR aus dem marinen Bakterium *Parvularcula oceani* [Inoue et al., 2016] als auch NsXeR aus dem halophilen Nanoarchaeum *Nanosalina* sp. J07AB43 [Shevchenko et al., 2017] ähneln insbesondere in der Umgebung der RSBH⁺ dem sensorischen Rhodopsin ASR aus *Anabaena nostoc*. Entsprechend ist in beiden Rhodopsinen genau wie in ASR auf der extrazellulären Seite der RSBH⁺ das zweite Gegenion gegen ein Prolin ausgetauscht und auf der zytoplasmatischen Seite der RSBH⁺ eine zusätzliche Asparaginsäure in Helix 7 eingeführt. Letzteres bildet in NsXeR einen Komplex mit einem Histidin in Helix 2 und stellt sowohl in PoXeR als auch in NsXeR den primären Protonenakzeptor dar. Während die Deprotonierung der RSBH⁺ somit zur konservierten Asparaginsäure

³DTD für BR, DTE für PR, DTK für ESR und DTG für PpR.

in Helix 7 erfolgt, wurde in der extrazellulären Proteinhälfte kein Protonendonor identifiziert und die RSB könnte direkt aus dem extrazellulären Medium reprotoniert werden [Inoue et al., 2018]. Geschwindigkeitsbestimmend für die Protonenaufnahme scheint ausschließlich die Retinalisomerisierung zu sein, welche zu fast gleichen Anteilen in eine 13-*cis*,15-*syn*- und all-*trans*,15-*anti*-Konfiguration verzweigt und teilweise erst nach Minuten vollständig in den Dunkelzustand zurückkehrt [Inoue et al., 2018]. Die physiologische Bedeutung eines einwärtsgerichteten Protonentransportes ist schließlich vollkommen unklar, da dieser zu einem Abbau des elektrochemischen Gradienten der Membran und entsprechend zu einem Energieverlust der Zelle führt.

1.3.4 Elektrophysiologische Untersuchungen von der Protonenpumpe zum Kanal

Erste elektrische Messungen an mikrobiellen Rhodopsinen wurden an Fragmenten der Purpurchlorophyllmembran sowie an rekonstituierten Proteoliposomen durchgeführt und zeigten für BR eine protonenmotorische Kraft von 300 mV sowie einen mehrphasigen Photostrom⁴ [Drachev et al., 1974, 1978, Keszthelyi and Ormos, 1980].

Eine im elektrophysiologischen Experiment eindeutige Membranorientierung, festgelegte Membranspannung sowie vollständige Kontrolle der extrazellulären Pufferbedingungen wurde erst später durch die heterologe Expression von BR in Eizellen des Krallenfrosches *Xenopus laevis* [Nagel et al., 1995, 1998] sowie in immortalisierten menschlichen embryonalen Nierenzellen („human embryonic kidney cells“ (engl.) kurz HEK293-Zellen) erreicht [Geibel et al., 2001]. Photoströme des heterolog exprimierten BR waren auch bei negativen Spannungen ausschließlich auswärtsgerichtet und zeigten in ihrer Amplitude eine deutliche Spannungs- und pH-Abhängigkeit [Nagel et al., 1998]. Gleichzeitig sind Photoströme von BR insbesondere in HEK293-Zellen klein und konnten auch durch die N-terminale Fusion der β -HK Untereinheit der Na^+/K^+ -ATPase aus Ratten als Membranlokalisierungssignal nur vierfach vergrößert werden [Geibel et al., 2001]. Zeitlich hochaufgelöste Messungen unter kontrollierten Ionenbedingungen sowie die Untersuchung von Mutanten geringerer Expression wurden hierdurch erschwert. Hervorragende Alternativen zur Untersuchung des auswärtsgerichteten Protonentransportes stellen jedoch die Protonenpumpen Archaerhodopsin-3 (Arch3) aus dem Archaeon *Halorubrum sodomense* [Chow et al., 2010] sowie CsR aus der antarktischen Alge *Coccomyxa subellipsoidea*⁵ dar [Zhang et al., 2011]. Während in Neuronen Arch3 deutlich größere Photoströme als BR zeigt, sind in *Xenopus laevis* Oozyten und HEK293 Zellen Pumpströme von CsR zehnfach größer als für BR und Arch3 [Vogt et al., 2015]. Obwohl weiterhin sowohl Arch3 und CsR Protonen ausschließlich aus der Zelle heraus transportieren, konnten für beide Proteine Mutanten gefunden werden, welche bei negativen Spannungen auch Einwärtsströme zeigen [Inoue et al., 2015, Vogt et al., 2015]. Die größten Einwärtsströme konnten in beiden Proteinen beobachtet werden, wenn sowohl Seitengruppen in der Retinalbindetasche (W182F in CsR und M128A/G132V in Arch3 äquivalent zu M118, G122 und W182 in BR) als auch entlang des Protonentransportweges (R83 in CsR und A225T in Arch3 äqui-

⁴Vier kinetische Komponenten wurden den einzelnen spektroskopischen Übergängen zugeordnet mit der größten Ladungsverschiebung im M \rightarrow O-Übergang [Keszthelyi and Ormos, 1980].

⁵Ursprünglich fälschlicherweise als CvRh der Alge *Chlorella vulgaris* zugeordnet [Vogt et al., 2015, Zhang et al., 2011].

valent zu R82 und A215 in BR) ausgetauscht wurden. Auch für die BR-Mutanten D85T oder D85N im Gegenionkomplex sowie die eubakteriellen Pumpen Proteorhodopsin oder *Gloeobacter*-Rhodopsin wurden Einwärtsströme bei negativen Spannungen und entweder gleichzeitiger blauer und gelber Belichtung (in BR [Tittor et al., 1994]) oder monochromatisch grüner Belichtung und niedrigem pH-Wert beobachtet (PR und GR) [Friedrich et al., 2002, Vogt et al., 2013]. Wohingegen Vogt et al. [2013] Einwärtsströme, die ausschließlich in Richtung des Protonengradienten fließen, als zusätzliche passive Kanalströme interpretieren, vermuten Friedrich et al. [2002] eine spannungsabhängige Invertierung der Protonentransportrichtung aufgrund des in Proteorhodopsinen bei niedrigem pH-Wert protonierten Ci1. Zur Erklärung verschiedener Pumprichtungen in Proteorhodopsin berufen sich Lörinczi et al. [2009] auf das IST-Modell des Protonentransportes. In diesem Modell werden zur Erklärung des Ladungstransportes Isomerisierung (I = „Isomerization“), Zugänglichkeitsänderung (S = „Switch“) und Ladungstransfer (T = „Transfer“) als kinetisch unabhängige Ereignisse verstanden, welche in ihrer Reihenfolge unterschiedlich sortiert sein können [Haupts et al., 1997]. Im Fall eines protonierten Ci1 würde sich entsprechend die Zugänglichkeit der RSBH⁺ ändern, bevor eine Protonenabgabe zur extrazellulären Seite erfolgt. Das Proton könnte dann je nach Spannung an das Zytoplasma abgegeben werden, bevor eine erneute Lichtabsorption und Zugänglichkeitsänderung eine Reprotonierung von der extrazellulären Seite ermöglicht [Lörinczi et al., 2009].

1.4 Passive Protonenleitung von Kanalrhodopsinen

Im Gegensatz zu Protonenpumpen, welche pro absorbiertem Lichtquant nur eine Ladung über die Membran transportieren, werden Ionenkanäle durch einen äußeren Reiz geöffnet und erlauben die Passage mehrerer Ladungen entlang des elektrochemischen Gradienten. Auch wenige Proteine können hierbei eine große und schnelle Stromantwort hervorrufen und zur Signalwahrnehmung, Weiterleitung und Verarbeitung beitragen. Im Augenfleck der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* wird ein lichtaktivierter Photorezeptorstrom bereits 50 µs nach Belichtung beobachtet, weshalb schon vor 27 Jahren einer unmittelbar Rhodopsin-assoziierten Kationleitfähigkeit vorhergesagt wurde [Harz et al., 1992]. Die hierfür verantwortlichen Photorezeptoren konnten zehn Jahre später identifiziert und in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert werden [Nagel et al., 2002, 2003, Sineshchekov et al., 2002]. Nach blauer Belichtung waren die Photoströme je nach Spannung ein- oder auswärtsgerichtet und beide Photorezeptoren wurden aufgrund der Kanalfunktion und Rhodopsinstruktur als Kanalrhodopsine bezeichnet (im Folgenden ChRs für „Channelrhodopsins“ (engl.)) [Nagel et al., 2002]. Obwohl im Augenfleck der Algengameten hauptsächlich CrChR1 für den Photorezeptorstrom verantwortlich ist [Berthold et al., 2008], erfuhr CrChR2 aufgrund einer höheren Expression in *Xenopus laevis* Oozyten und Säugetierzellen bis heute größeres wissenschaftliches Interesse [Nagel et al., 2003].

Mehr als 50 weitere ChRs wurden seither in Chlorophyten Algen gefunden [Govorunova et al., 2017a]. Nur ein kleiner Teil dieser ChRs konnte bisher im Detail untersucht werden, offenbarte jedoch bereits große Unterschiede in der Lichtsensitivität, Photostromkinetik, Proteinabsorption sowie Protonen- und Kationselektivität der verschiedenen ChRs [Hou et al., 2012, Klapoetke

et al., 2014, Zhang et al., 2008, 2011]. Eine mehr als 40 nm weiter rotverschobene Absorption als alle anderen ChRs zeigt Chrimson aus der Alge *Chlamydomonas noctigama* [Klapoetke et al., 2014] und eine besonders hohe Protonenselektivität wurde für *DsChR1* aus der halophilen Alge *Dunaliella salina* beschrieben [Zhang et al., 2011]. Die molekularen Bestimmungsfaktoren der Rotlichtabsorption von Chrimson sowie der erhöhten Protonenselektivität von *DsChR1* sind jedoch unbekannt.

Mehr als 20 weitere ChRs wurde schließlich in Cryptophyten Algen entdeckt, [Govorunova et al., 2015, 2016b, 2017a] welche sowohl Kationen als auch Anionen leiten (abgekürzt als CCRs und ACRs für „Cation Conducting ChRs“ (engl.) und „Anion Conducting ChRs“ (engl.)). Die Cryptophyten CCRs *GtCCR1* - *GtCCR4* aus der Alge *Guillardia theta* besitzen in Helix 3 überraschenderweise ein DTD-Motiv wie mikrobielle Protonenpumpen [Govorunova et al., 2016b, Sineshchekov et al., 2017] und unterscheiden sich mechanistisch wesentlich von Chlorophyten-CCRs. Alle Cryptophyten-ChRs weisen schließlich eine reduzierte Protonenleitfähigkeit auf [Govorunova et al., 2015, 2016a,b, Wietek et al., 2016, Yamauchi et al., 2017] und stehen entsprechend nicht im Fokus dieser Arbeit.

1.4.1 Molekulare Struktur der Kanalrhodopsinchimäre C1C2

ChRs bilden stabile Dimere [Hoffmann et al., 2010]. Zwei identische Untereinheiten sind hierbei entlang Helix 3 und 4 aneinander gelagert [Müller et al., 2011]. Konservierte Cysteine können weiterhin durch Disulfidbrücken im extrazellulären N-Terminus zur Dimerinteraktion beitragen, sind jedoch sowohl funktional als auch für die Dimerisierung entbehrlich [Sattig et al., 2013]. Die erste hochaufgelöste ChR-Struktur konnte für die Chimäre C1C2 - bestehend aus den ersten fünf Transmembranhelices von *CrChR1* und den letzten beiden Helices aus *CrChR2* - gelöst werden und zeigt den geschlossenen Dunkelzustand des Kanals [Kato et al., 2012] (Abb. 1.4).

Eine periodische Folge von fünf konservierten Glutaminsäuren in Helix 2 flankiert die geschlossene Pore, die zwischen Helix 1, 2, 3 und 7 vermutete wird. Zur besseren Vergleichbarkeit verschiedener ChRs werden die Helix-2-Glutaminsäuren im Folgenden nach Schneider et al. [2015] entsprechend ihrer Position als E1' bis E5' bezeichnet (nummeriert von der intrazellulären zur extrazellulären Seite). Die ionenleitende Pore befindet sich entsprechend nicht an der Dimerrenzfläche, wie auf Grundlage niedrig aufgelöster kryoelektronenmikroskopischer Messungen vorübergehend vermutet wurde [Müller et al., 2011], sondern verläuft genau wie der Protonentransport von BR durch das Monomer selbst. Der extrazelluläre Halbkanal scheint durch eine Auswärtsbeugung von Helix 1 und 2 bereits im Dunkelzustand vorgebildet zu sein und durchspannt die Dunkelstruktur von C1C2 als extrazellulärer Zugangskanal vom extrazellulären Medium bis zum Gegenionkomplex der $RSBH^+$ (Abb. 1.4 A). Die Abwesenheit definierter Elektronendichten im extrazellulären Zugangskanal lässt auf eine ungeordnete Wasserverteilung schließen.

Der intrazelluläre Halbkanal ist im Dunkelzustand hydrophob versperrt. Der geschlossene Zustand wird hier durch interhelikale Wasserstoffbrückenbindungen im sogenannten „Zentralen Tor“ nahe der $RSBH^+$ sowie im „Inneren Tor“ an der zytoplasmatischen Membrangrenzfläche stabilisiert. Im Zentralen Tor verknüpfen S102 (S63 in *CrChR2*), E129 (E90 in *CrChR2*) und N297 (N258 in

CrChR2) Helix 1, 2 und 7 und unterbinden einen weiteren Wassereinstrom [Kuhne et al., 2015, Takemoto et al., 2015] (Abb. 1.4 B). Im Inneren Tor bilden E1' und R307 (R268) sowie E2' und H173 (H134) potentielle Salzbrücken zwischen Helix 2, 3 und 7. Die Interaktion von Helix 3 und 7 wird zusätzlich durch ein von H173 (H134) und den Proteinrückgratcarbonylgruppen von L177 (L138) und G303 (G264) konjugiertes Wasser stabilisiert (Abb. 1.4 C). In Helix 1 könnte Y109 (Y70) zum Verschluss des intrazellulären Halbkanals beitragen und ist möglicherweise über ein kristallographisch nicht aufgelöstes Wasser mit Helix 1 und 2 verbunden [Kamiya et al., 2013]. Die RSBH^+ wird auch in ChRs durch einen Gegenionkomplex aus den Carbonsäuren E162 in Helix 3 (E123 in *CrChr2*, Ci1) und D292 in Helix 7 (D253, Ci2) stabilisiert (Abb. 1.4 D). Im Gegensatz zu BR interagieren beide Carbonsäuren ohne ein zusätzliches Wasser direkt mit der RSBH^+ . Der pK_a -Wert der beiden Carbonylgruppen wird durch ein konserviertes Lysin in Helix 2 (K132 in C1C2 und K93 in *CrChR2*) moduliert und variiert zwischen verschiedenen ChRs [Li et al., 2014a]. Während in *CrChR2* beide Gegenionreste deprotoniert vorliegen, scheint in C1C2 zumindest unter sauren Bedingungen - wie auch für die Kristallisation verwendet - Ci1 protoniert

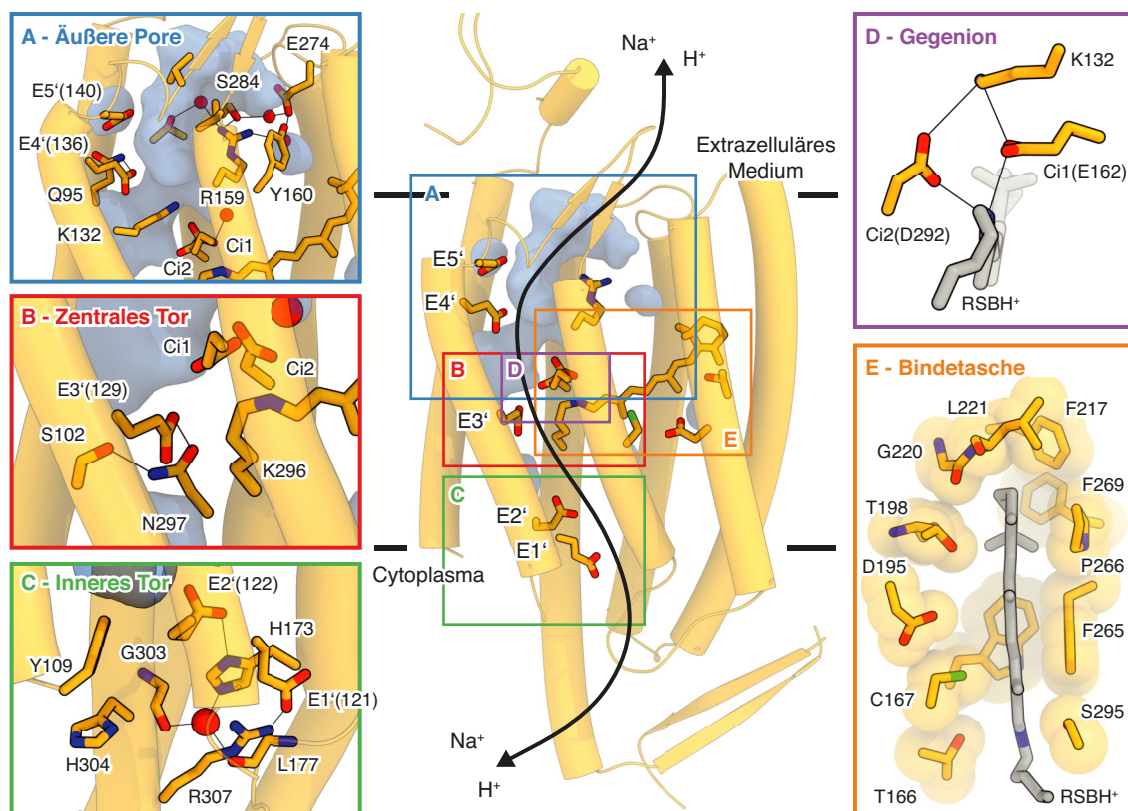


Abbildung 1.4: Struktur der Kanalrhodopsinchimäre C1C2 mit einem Überblick der Monomerstruktur entsprechend Kato et al. (PDB: 3ug9) in der Mitte. Der schwarze Pfeil skizziert die Lokalisation der vermuteten Pore. Proteinkavitäten wurden mit dem Computerprogramm HOLLOW [Ho and Gruswitz, 2008] berechnet und sind blau gefärbt. Konservierte Glutaminsäuren in Helix 2 sind mit E1' bis E5' für E121, E122, E129, E136 und E140 abgekürzt. Die Gegenionseitengruppen E162 und D292 werden als Ci1 und Ci2 bezeichnet. Einzelne Ausschnitte zeigen die äußere Pore (A), das Zentrale Tor (B), das Innere Tor (C), das Gegenion (D) sowie die Retinalbindetasche von der intrazellulären Seite (E). Wichtige Wasserstoffbrückenbindungen über eine Entfernung von weniger als 3 Å sind als Linien eingezeichnet.

zu sein [Watanabe et al., 2013]. Im grünlichtaktivierten *CaChR1* aus *Chlamydomonas augustae* ist das Helix 2 Lysin nicht konserviert und C11 verbleibt bis zu einem alkalischen pH-Wert von ~ 9 protoniert [Li et al., 2014a].

In der Retinalbindetasche wird die Polyenkette des Retinals auf drei Seiten von aromatischen Aminosäuren flankiert (W163/124, W262/223, F265/226 in C1C2/*CrChR2*) (Abb. 1.4 E). Auf der vierten Seite finden sich hingegen in Helix 3 und 4 mit C167 (C128), D195 (D156) und T198 (T159) drei polare Aminosäuren von wesentlicher funktionaler Relevanz. Die Aminosäuren C167 und D195 sind in vielen ChRs essentiell für einen schnellen Photozyklusdurchlauf [Bamann et al., 2010, Berndt et al., 2009] und wurden aufgrund ihres Einflusses auf die Photostromkinetik ursprünglich als DC-Tor bezeichnet [Nack et al., 2010] („DC-gate“ (engl.)). Da beide Aminosäuren jedoch in keinem direkten Kontakt zur vermeintlich ionenleitenden Pore stehen, scheint die alternative Bezeichnung als DC-Paar treffender [Schneider et al., 2015]. Das T198 (T159 in *CrChR2*) ist dagegen in *CrChR2* vor allem für die Proteinstabilität und Retinalinkorporation von Bedeutung [Nagel et al., 2013]. Die Mutante *CrChR2* T159C wirkt sich auf beides positiv aus und resultiert in größeren Photoströmen des heterolog exprimierten Proteins [Berndt et al., 2011].

Erst in den letzten Jahren konnten weitere Dunkelstrukturen der geschlossenen Zustände einer blauverschobenen und einer anionenleitenden C1C2 Mutante [Kato et al., 2015b, 2018] sowie der natürlichen ChRs *CrChR2* [Volkov et al., 2017], *GtACR1* aus *Guillardia theta* [Kim et al., 2018] und - in Zusammenarbeit mit der elektrophysiologischen Untersuchung dieser Arbeit - des rotverschobenen ChRs Chrimson [Oda et al., 2018] gelöst werden. Unterschiede der verschiedenen Strukturen werden unter Berücksichtigung der Ergebnisse dieser Arbeit an späterer Stelle diskutiert.

1.4.2 Der Kanalrhodopsinphotozyklus

Das dunkeladaptierte *CrChR2* inkorporiert genau wie C1C2 zu 100% all-*trans*,15-*anti*-Retinal [Becker-Baldus et al., 2015, Bruun et al., 2015]. Nach Lichtabsorption isomerisiert dieses innerhalb von 0,1 - 2,7 ps in eine 13-*cis*-Konfiguration⁶ und initiiert eine Abfolge von Absorptionsänderungen, die auch für ChRs einzelnen Photozyklusintermediaten zugeordnet und in einem Photozyklus zusammengefasst werden können [Hontani et al., 2017, Schnedermann et al., 2016, Verhoeven et al., 2010] (Abb. 1.5). Wie in BR wird wenigstens ein frühes rotverschobenes K-ähnliches Intermediat⁷ gefolgt von einem blauverschobenen M-Intermediat mit deprotonierter RSB beschrieben [Bamann et al., 2008, Ernst et al., 2008, Ritter et al., 2008]. Ein zusätzlicher blauverschobener L-ähnlicher Zustand tritt in C1C2, *PsChR* aus *Platymonas subcordiformis* [Szundi et al., 2015] und der Kanalrhodopsinchimäre ReaChR auf [Krause et al., 2017].

Die Kanalöffnung erfolgt für *CrChR2* nach 200 μ s während des M-Zustandes [Bamann et al., 2008, Lórenz-Fonfría et al., 2015a, Ritter et al., 2008], was auch für ChRs auf die Existenz von wenigstens zwei M-Zuständen (geschlossen und leitend) hindeutet [Lórenz-Fonfría and Heber-

⁶Die schnellste Photoisomerisierung mit einer Kinetik von 110 fs konnte hierbei für *CaChR1* aus *Chlamydomonas augustae* beobachtet werden [Schnedermann et al., 2016].

⁷Eine Drift der K-Zustandsabsorption deutet hierbei auf wenigstens zwei sukzessive K-Zustände in *CrChR2* und C1C2 hin [Hontani et al., 2017, Scholz et al., 2012].

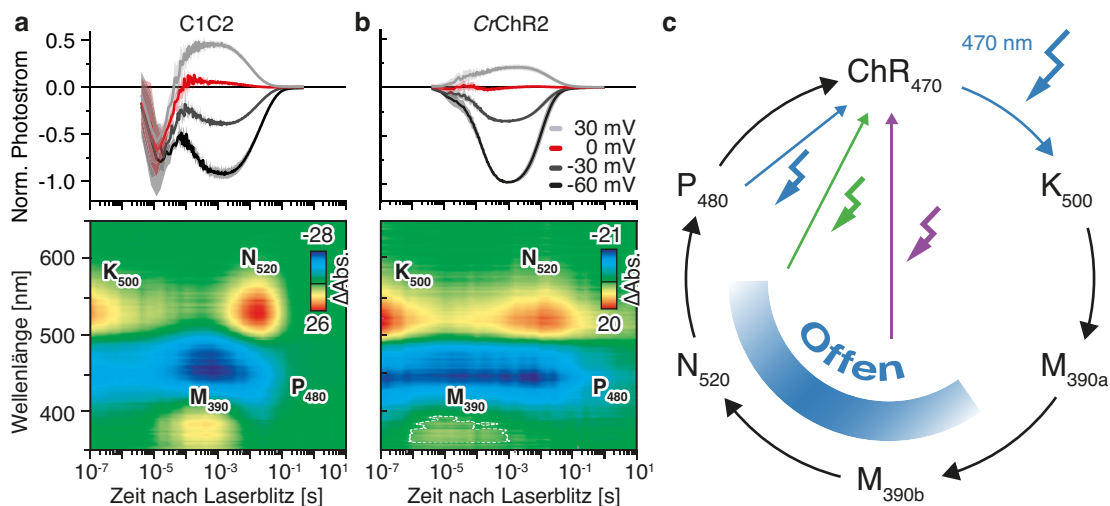


Abbildung 1.5: Der Kanalrhodopsinphotozyklus von C1C2 und CrChR2 (a) Oben: Photoströme von C1C2 in HEK293-Zellen nach Anregung mit einem 7 ns-Laserblitz von 470 nm in 110 mM NaCl und $pH_{i,e}$ 7,2. Unten: Absorptionsänderungen (in mOD) des aufgereinigten C1C2-Proteins nach Anregung mit einem 460 nm, 10 ns-Laserblitz. (b) Oben: Photoströme von CrChR2 WT in HEK293-Zellen nach Anregung mit einem 7 ns-Laserblitz wie in (a). Unten: Absorptionsänderungen (in mOD) des aufgereinigten CrChR2-H134R-Proteins nach Anregung mit einem 460 nm, 10 ns-Laserblitz. (c) Photozyklus von CrChR2 und C1C2 mit unterschiedlichen Lichtreaktionen zur Aktivierung des Dunkelzustandes und Bleichung der Offenzustände M_{390b} und N₅₂₀ sowie des späten Photozyklusintermediats P₄₈₀. Die Blitzlichtphotolysedaten für C1C2 und CrChR2-H134R wurden gemessen, ausgewertet und bereitgestellt von Dr. Benjamin S. Krause und sind in ähnlicher Form bereits in der Dissertationsschrift „Spektroskopische Charakterisierung der grün-absorbierenden Kanalrhodopsin-Chimäre ReaChR“ publiziert [Krause, 2018].

le, 2014] (Abb. 1.5 a und b). Photoströme bleiben nach Reprotonierung der RSBH⁺ erhalten und nehmen beim Übergang in den rotverschobenen N-Zustand vor allem bei positiven Spannungen weiterhin zu [Lórenz-Fonfría et al., 2015a]. Zeitgleich mit dem N-Zustandszerfall erfolgt das Kanalschließen. Nach dem Photostromrückgang kann ein weiteres langlebiges P₄₈₀ Photointermediat beobachtet werden, welches sich in seiner Absorption kaum vom Dunkelzustand unterscheidet und erst nach mehreren Sekunden bis Minuten biphasisch in den Ausgangszustand zurückkehrt [Bamann et al., 2008, Ritter et al., 2008]. In DC-Paar-Mutanten (z.B. C128A, C128T, D156A) ist sowohl der Photostromrückgang als auch der Zerfall des M- und N-Zustandes verlangsamt [Bamann et al., 2010, Stehfest et al., 2010]. M- und N-Zustand sind weiterhin im Gleichgewicht miteinander und können durch Belichtung mit UV- oder grünem Licht photoreaktiv in den geschlossenen Dunkelzustand zurückgeführt werden.

Zeitgleich zur Deprotonierung der RSBH⁺ können in vielen ChRs transiente, meist⁸ auswärtsgerichtete Photoströme beobachtet werden [Sineshchekov et al., 2013]. Diese frühen Photoströme werden in „Whole-Cell-Patch-Clamp“-Messungen zeitlich kaum aufgelöst⁹ und variieren zwischen verschiedenen ChRs stark. Insbesondere für CrChR2 konnte von Sineshchekov et al. kein

⁸Insbesondere in C1C2 sind die frühen transienten Ströme während der Deprotonierung jedoch einwärtsgerichtet (Abb. 1.5 a).

⁹Die Zeitauflösung der „Whole-Cell-Patch-Clamp“-Messungen an HEK293-Zellen ist durch den Zugangswiderstand der Pipette und die Membrankapazität begrenzt, welche gemeinsam einen RC-Tiefpassfilter bilden [Ogden, 1994]. Signale, schneller als die Zeitkonstante $\tau_{RC} = 50-100 \mu s$ dieses Tiefpassfilters, könnten entsprechend verzerrt sein und werden abgeschwächt [Lórenz-Fonfría et al., 2013].

früher Ladungstransfer beobachtet werden [Sineshchekov et al., 2013] (Abb. 1.5 b). Trotzdem zeigen pH-Messungen mit einem löslichen pH-sensitiven Farbstoff für das in Detergens solubilisierte CrChR2 eine Protonenabgabe zeitgleich zur Reprotonierung der RSBH⁺ sowie eine biphasische Protonenaufnahme während des N- und P₄₈₀-Zerfalls [Nack et al., 2012]. Die zusätzlich bei 0 mV gemessenen Auswärtsströme an fusionierten HEK-Zellen führten zu der These, dass CrChR2 eine undichte Protonenpumpe wäre [Feldbauer et al., 2009]. Als Protonentransportrate wurden unabhängig voneinander 0,2 - 0,4 Protonen pro Photozyklus berechnet [Feldbauer et al., 2009, Nack et al., 2012].

1.4.3 Protonentransferreaktionen während des Photozyklus

Absorptionsspektroskopisch beobachtete Protonierungsänderungen der RSBH⁺ im Zeitraum der Kanalöffnung deuten auf eine funktionale Bedeutung von Protonentransferreaktionen für die Kanalöffnung von ChRs hin. In CrChR2 wurden beide Gegenioncarbonsäuren als potentielle Protonenakzeptoren des Protons der Schiffischen Base vorgeschlagen [Kuhne et al., 2015, Lórenz-Fonfría et al., 2013]. Wohingegen Ci2 jedoch in allen ChRs konserviert vorliegt, ist Ci1 im protonenselektiven DsChR1 aus *Dunaliella salina* sowie ShChR aus *Stigeoclonium helveticum* (auch Chronos genannt) gegen ein ungeladenes Alanin beziehungsweise Methionin ausgetauscht und entsprechend nicht konserviert [Klapoetke et al., 2014, Zhang et al., 2011]. Auch in CrChR2 bleiben die Photoströme bei neutraler Substitution von Ci1 erhalten [Gunaydin et al., 2010], wohingegen Mutationen von Ci2 den Kanalstrom in seiner Amplitude stark reduzieren [Lórenz-Fonfría et al., 2013]. Nichtsdestotrotz kommt es sowohl für Mutanten von Ci1 als auch von Ci2 weiterhin zu einer Deprotonierung der RSBH⁺ [Lórenz-Fonfría et al., 2013] und alternative Protonentransferwege sowohl zu Ci1 als auch zu Ci2 wurden vorgeschlagen [Kuhne et al., 2015, Sineshchekov et al., 2013].

Einen interessanten Sonderfall stellt CaChR1 dar, in welchem das Ci1 bereits im Dunkelzustand protoniert vorliegt [Li et al., 2014a]. Trotzdem sind die Deprotonierung der RSBH⁺ und der zeitlich korrelierte transiente Photostrom überraschenderweise für neutrale Substitutionen von Ci1 und nicht von Ci2 verlangsamt [Sineshchekov et al., 2013] und deuten entsprechend auf Ci1 als Protonenakzeptor der RSBH⁺ hin, obwohl dieses bereits im Dunkelzustand protoniert ist. Infrarotspektroskopische Messungen erklären diesen scheinbaren Widerspruch durch einen zweistufigen „Protonentransfer-Relay“-Mechanismus [Ogren et al., 2015a]. Somit erfolgt in CaChR1 bereits im K-Zustand ein Protonentransfer von Ci1 zu Ci2, wodurch Ci1 anschließend als Protonenakzeptor der RSBH⁺ zur Verfügung steht [Ogren et al., 2015b].

Als Protonendonator der deprotonierten RSB wurde in CrChR2 D156 vorgeschlagen, welches zeitgleich zur Reprotonierung der RSB deprotoniert wird [Lórenz-Fonfría et al., 2013]. Nicht nur aufgrund einer Entfernung von $\sim 9,7 \text{ \AA}$ ist D156 als Protonendonator der RSB umstritten, sondern auch die zeitliche Korrelation beider Protonierungsänderungen ist nicht in jedem ChR gegeben [Schneider et al., 2015]. Entsprechend erfolgt in der Kanalrhodopsinchimäre ReaChR die Deprotonierung des homologen Aspartats D196 erst verzögert zur Reprotonierung der RSB während des N-Zerfalls [Kaufmann et al., 2017]. Als alternativer Protonendonator wurde entsprechend von

Kaufmann et al. [2017] sowohl das transient protonierte Ci2 als auch Wasser der leitenden Pore vorgeschlagen.

Zeitgleich mit dem N-Zustandszerfall und dem Kanalschließen erfolgt in *CrChR2* die Reprotonierung von D156 sowie die Deprotonierung des Ci2 [Lórenz-Fonfría and Heberle, 2014, Lórenz-Fonfría et al., 2013]. Die Reprotonierung von D156 erfolgt wiederum zeitgleich mit einer Protonenaufnahme aus dem umliegenden Medium [Lórenz-Fonfría et al., 2013, Nack et al., 2012] und ein Reprotonierungsweg entlang von Helix 3 und 4 wurde vorgeschlagen [Lórenz-Fonfría and Heberle, 2014, Volkov et al., 2017], konnte jedoch experimentell bisher nicht belegt werden.

Schließlich wurde insbesondere die Deprotonierung von E3' im Zentralen Tor kontrovers diskutiert. Im Dunkelzustand liegt E3' in *CrChR2* (E90) protoniert vor [Ritter et al., 2008], wird jedoch im Laufe des Photozyklus deprotoniert [Eisenhauer et al., 2012]. Infrarotspektroskopische Messungen in Detergens zeigen eine frühe Änderung der H-Brückenwechselwirkungen von E3' sowie eine späte Deprotonierung während des N-Zustandszerfalls und des Kanalschließens [Lórenz-Fonfría et al., 2013], wohingegen Fourier-transformierte Infrarotmessungen im Lipidrekonstituierten, dunkeladaptierten Protein eine frühe Deprotonierung bereits vor der Kanalöffnung nahelegen [Kuhne et al., 2015]. Als molekulare Bedeutung der späten Deprotonierung von E3' nach Kanalschließen wurde eine Konsolidierung interhelikaler Wechselwirkungen zur Stabilisierung der geschlossenen Pore vorgeschlagen [Lórenz-Fonfría and Heberle, 2014]. Für eine frühe Deprotonierung von E3' zeigen molekulardynamische Simulationen eine Hydratisierung des Zentralen Tores zur Vorbereitung der Porenöffnung [Kuhne et al., 2015]. Die Reprotonierung von E3' erfolgt unstrittig als letzter Schritt des Photozyklus während des P₄₈₀-Zerfalls [Kuhne et al., 2015, Lórenz-Fonfría et al., 2013] durch eine Protonenaufnahme direkt aus dem äußeren Medium [Nack et al., 2012].

1.4.4 Konformationelle Änderungen während der Kanalöffnung

Große Strukturänderungen erfolgen in *CrChR2* bereits kurz nach der Retinalisomerisierung und sind in Infrarotspektren als ausgeprägte Amidbanden bereits zeitgleich zum K-Zustand zu erkennen [Radu et al., 2009, Ritter et al., 2008]. Gleichzeitig zu beobachtende Verschiebungen von Infrarotbanden der Seitengruppen E3' und D156 [Lórenz-Fonfría et al., 2013, Ritter et al., 2008] wurden als H-Brückenänderungen beider Reste interpretiert [Lórenz-Fonfría and Heberle, 2014] und deuten auf eine frühe Reorientierung von Helix 2, 3 und 4 hin. Die tatsächliche Porenöffnung erfolgt erst später im Photozyklus und wird durch eine schrittweise Hydratisierung von Transmembranhelices in zwei Phasen - zeitgleich und zeitversetzt zur Deprotonierung der RSBH⁺ - eingeleitet [Lórenz-Fonfría et al., 2015a].

Je nach Protonierung von E90 wurden unterschiedliche Modelle zur Kanalöffnung von *CrChR2* diskutiert. Im sogenannten „E90-Helix-Tilt“-Modell (abgekürzt als EHT-Modell) kommt es nach der Retinalisomerisierung zu einer Torsion von Helix 7 und einem Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindung von E3' und N258. Infolgedessen klappt E3' zur extrazellulären Seite um, wo es in deprotonierter Form eine Salzbrücke zum benachbarten K93 bildet. Diese neu ausgebildete Salzbrücke führt in molekulardynamischen Simulationen zu einem Auswärtkippen von Helix

2 und einen Wassereinstrom über den extrazellulären Zugangskanal [Kuhne et al., 2015]. Alternativ zeigen neuere QM/MM-Simulationen, dass auch ohne Deprotonierung von E3' ein H-Brückenänderung im Zentralen Tor einen Wassereinstrom einleiten kann und entsprechend eine Kanalöffnung auch mit protoniertem E3' möglich ist [Ardevol and Hummer, 2018]. Als Folge der Retinalisomerisierung wird in diesen Simulationen der Stickstoff der RSB um 90° gedreht und bildet eine neue Wasserstoffbrückenbindung mit dem Ci2, wodurch Ci1 eine Wasserstoffbrückenbindung mit E3' bilden kann. Dadurch werden die Dunkelzustandsinteraktionen von Helix 7 und Helix 3 (RSB und Ci1) und Helix 7 und Helix 2 (N258 und E3') ersetzt durch Wechselwirkungen von Helix 7 und Helix 7 (RSB und Ci2) und Helix 2 und Helix 3 (E3' und Ci1), was den Wassereinstrom von extrazellulärer Seite des Proteins ermöglicht. Nach Deprotonierung der RSBH⁺ könnte die C20-Methylgruppe des Retinals das W223 der Retinalbindetasche verschieben und weitergeleitet an das Inneren Tores zur vollständigen Öffnung der Pore führen [Ardevol and Hummer, 2018, Takemoto et al., 2015].

Im vermeintlichen Offen Zustand zeigen kryoelektronenmikroskopische Messungen der belichteten langsamen *CrChR2-C128T*-Mutante ein Auseinanderklappen von Helix 6 und 7 (ähnlich wie in BR) sowie eine Umorientierung und einen Strukturverlust von Helix 2 [Müller et al., 2015]. Große konformationelle Änderungen am zytoplasmatischen Ende von Helix 2 und ein Auseinanderklappen von Helix 2 und 6 konnte auch durch Fluoreszenzanisotropie und Elektronenspinresonanzmessungen für den photostationären Zustand langsamer *CrChR2*-Mutanten bestätigt werden [Krause et al., 2013, Volz et al., 2016], wurde jedoch auch für den *CrChR2* WT beobachtet, in welchem nach Belichtung zusätzlich zum leitenden Zustand auch das P₄₈₀-Intermediat akkumuliert wird [Sattig et al., 2013]. Eine komplette Rückbildung der im Laufe des Photozyklus großen strukturellen Änderung sowie eine vollständige Dehydratisierung der Pore wurden auch in infrarotspektroskopischen Messungen erst Sekunden nach dem Kanalschließen bei der Rückkehr in den ursprünglichen Dunkelzustand beobachtet [Lórenz-Fonfría et al., 2015a, Radu et al., 2009, Ritter et al., 2008] und eine eindeutige Zuordnung der beobachteten Strukturänderungen zum leitenden Zustand des Kanals ist bisher nicht möglich. Die Verwendung infrarotsensitiver unnatürlicher Aminosäuren erlaubte es jedoch, Hydratisierungsänderung entlang der Pore zu lokalisieren und zeigte, dass das Kanalschließen mit spezifischen Hydratisierungsänderungen im intrazellulären Tor einhergeht [Krause et al., 2019]. Andere Bereiche des Proteins könnten hingegen auch in P₄₈₀ weiterhin hydratisiert bleiben und die auch spät im Photozyklus großen Strukturänderungen erklären.

1.4.5 Photozyklus und Lichtadaptation

Bei längerer Belichtung inaktivieren die Photoströme der meisten ChRs von einem transienten zu einem stationären Photostrom [Nagel et al., 2003] (Abb. 1.6 a und b). Die Ionenselektivität des transienten und stationären Photostroms unterscheidet sich in *CrChR2* [Berndt et al., 2010], weshalb sich bei längerer Belichtung nahe des Umkehrpotentials die Photostromrichtung ändern kann. Eine vollständige Erholung des transienten Photostroms erfolgt erst nach längeren Dunkelperioden (Abb. 1.6 c). Kinetisch können die komplexen Photoströme unter Dauerlicht durch zwei

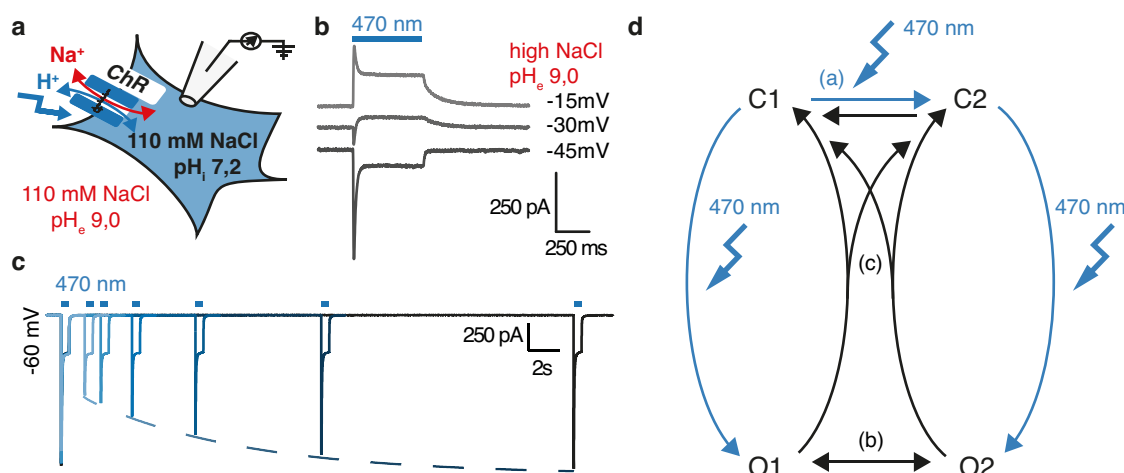


Abbildung 1.6: Lichtadaptation des Kanalrhodopsinphotostroms. (a und b) Unter Dauerlicht inaktivieren die Photoströme von CrChR2 in HEK293-Zellen von einem transienten Peakstrom auf ein stationäres Stromniveau. Die Protonenselektivität des transienten und stationären Photostroms unterscheidet sich und bei symmetrischer Na^+ -Konzentration sowie auswärtsgerichteten Protonengradienten fließen nahe des Umkehrpotentials im transienten Strom Na^+ -Ionen in die Zelle hinein und im stationären Strom H^+ aus der Zelle heraus. (c) Langsame Erholung des transienten Photostroms bei -60 mV und $\text{pH}_{i/e} 7,2$ nach unterschiedlich langen Dunkelperioden. (d) Photozyklusmodell von ChRs mit zwei geschlossenen Dunkelzuständen (C1 und C2) und zu diesen gehörenden Offenzuständen (O1 und O2) sowie verschiedenen Übergängen zwischen beiden Photozyklen [Hegemann et al., 2005], entweder unmittelbar nach Belichtung des C1 (a) [Bruun et al., 2015], als Gleichgewicht der Offenzustände (b) [Nikolic et al., 2009] oder nach Kanalschließen (c) [Stehfest and Hegemann, 2010]. Photoreaktionen sind blau und thermische Übergänge schwarz.

parallele Photozyklen mit jeweils einem geschlossen und einem Offenzustand beschrieben werden [Hegemann et al., 2005] (Abb. 1.6 d). Zur Erklärung des Photostromrückganges wurde sowohl eine verringerte Leitfähigkeit des zweiten Offenzustandes als auch eine geringere Quantenausbeute der Photoisomerisierung des zweiten Photozyklus vorgeschlagen [Nikolic et al., 2009]. Der Übergang in den lichtadaptierten Photozyklus könnte sowohl über ein Gleichgewicht der Offenzustände [Hegemann et al., 2005] als auch durch eine Photozyklusverzweigung nach Kanalschließen erfolgen [Stehfest and Hegemann, 2010].

Auch spektroskopisch wurden verschiedene Verzweigungsreaktionen des Photozyklus diskutiert [Bamann et al., 2010, Bruun et al., 2015, Lórenz-Fonfría et al., 2013, Ritter et al., 2008, 2013]. Die trotz langer Lebenszeit, begrenzte Akkumulation des langlebigen P_{480} -Intermediats unter Dauerlicht wurde sowohl durch eine zusätzliche Photoreaktion des P_{480} -Zustandes (nach D_{470} oder K_{500}) [Ritter et al., 2008] begründet, als auch durch eine alternative Relaxation des N_{520} -Offenzustandes (direkt in den Dunkelzustand) erklärt [Lórenz-Fonfría et al., 2013]. Je nach Belichtungsdauer und Farbe ändert sich in CrChR2 schließlich die Retinalisomerenzusammensetzung im geschlossenen Kanal [Ritter et al., 2013]. In Raman-Resonanz-Messungen wurden sowohl all-*trans*,15-*anti* als auch 13-*cis*,15-*syn*-Retinal nachgewiesen und Dunkelzuständen der unterschiedlichen Photozyklen zugeordnet [Bruun et al., 2015]. Ein Übergang aus der 100%-igen all-*trans*-Konfiguration in einen apparent dunkeladaptierten Zustand mit gemischter Retinalisomerisierung könnte nach Bruun et al. bereits während der spektroskopischen Messung selbst erfolgen und deu-

tet auf einen frühen, lichtinduzierten Übergang zwischen den beiden parallelen Photozyklen hin [Bruun et al., 2015].

1.4.6 Ionenleitfähigkeit und Selektivität von Kanalrhodopsinen

Die Einzelkanalleitfähigkeit von ChRs ist im Vergleich zu anderen Kationenkanälen klein und variiert zwischen verschiedenen ChRs¹⁰ [Govorunova et al., 2013, Nagel et al., 2003]. Für CrChR2 konnte durch Rauschanalyse eine Einzelkanalleitfähigkeit von 40 - 100 fS bestimmt werden, welche bei negativen Spannungen zunimmt [Feldbauer et al., 2009]. In Übereinstimmung mit früheren Berechnungen für den Augenfleck der Alge, werden 10 - 100 Ladungen pro Photozyklusdurchlauf transportiert [Deisseroth and Hegemann, 2017, Harz et al., 1992, Hegemann, 2008].

Im Augenfleck von *Chlamydomonas reinhardtii* werden im Photorezeptorstrom vor allem Kalziumionen geleitet [Harz and Hegemann, 1991, Hegemann, 2008]. Heterolog exprimiert leiten hingegen sowohl CrChR1 als auch CrChR2 vorwiegend Protonen [Nagel et al., 2002, 2003]¹¹. In *Xenopus laevis* Oozyten und HEK293-Zellen ist die Präferenz für Protonen sogar $\sim 10^6$ -mal höher als für alle anderen Kationen [Kleinlogel et al., 2011a, Nagel et al., 2003]. Insbesondere bei niedriger Protonenkonzentration - wie sie oft physiologisch vorliegen - werden jedoch unabhängig vom Expressionssystem auch andere Kationen geleitet [Berthold et al., 2008, Nagel et al., 2003]. Von diesen am Besten geleitet wird trotz seiner Größe das organische Kation Guanidinium (siehe auch Abb. A.2). Für anorganische, monovalente Kationen konnte eine leichte Präferenz entsprechend der dehydrierten Ionengröße mit $P_{Li^+} > P_{Na^+} > P_{K^+} > P_{Cs^+}$ beobachtet werden und Kationen könnten die Pore zumindest teilweise dehydriert passieren [Berthold et al., 2008, Gaiko and Dempksi, 2013, Nagel et al., 2003]. Auch divalente Kationen wie Ca^{2+} und zu einem geringeren Anteil auch Mg^{2+} werden geleitet, wobei die Kalziumleitfähigkeit von CrChR2 und C1C2 (ursprünglich auch als ChEF bezeichnet) um mehr als 80% kleiner ist als für Na^+ -Ionen [Kleinlogel et al., 2011a, Lin et al., 2009] und größere Photoströme divalenter Kationen erst bei höheren Konzentrationen derselben gemessen werden können [Schneider et al., 2013]. Insbesondere Mg^{2+} scheint die Pore nur langsam zu passieren, was zu einer Reduktion des Gesamtphotostroms führt [Schneider et al., 2013]. Interessanterweise ändert sich die Ionenselektivität von CrChR2 bei längerer Belichtung. Wohingegen nahe des Umkehrpotentials die Protonenselektivität vom transienten zum stationären Photostrom unter längerer Belichtung zunimmt [Berndt et al., 2010], scheint bei negativer Spannung - unter Berücksichtigung von Ionenkompetition in einem kinetischen Modell - die Protonenselektivität im stationären Strom abzunehmen [Schneider et al., 2013].

Die Ionenselektivität anderer natürlicher und künstlicher ChR-Varianten ist in den meisten Fällen kaum oder nur flüchtig untersucht, unterscheidet sich jedoch zwischen den wenigen bereits untersuchten Varianten stark. Entsprechend besitzen PsChR aus *Platymonas Tetraselmis subcordiformis*, MvChR1 aus *Mesostigma viride* [Govorunova et al., 2013] und GtCCR1 - GtCCR4 aus *Guillardia theta* [Govorunova et al., 2016b] eine erhöhte Kationenselektivität, wohingegen in VcChR1

¹⁰Im Vergleich zu CrChR2 wurde eine dreifach größere Einzelkanalleitfähigkeit für PsChR aus *Platymonas subcordiformis* [Govorunova et al., 2013] und eine zehnfach höhere Leitfähigkeit für die anionenselektiven Kanäle GtACR1 und GtACR2 aus *Guillardia theta* bestimmt [Govorunova et al., 2015].

¹¹Interessanterweise wurde auch in *Chlamydomonas* ein Protoneneinstrom im Augenfleck beobachtet, jedoch ausschließlich bei saurem pH-Wert und zeitlich verzögert zum Kalziumeinstrom [Ehlenbeck et al., 2002].

aus *Volvox carteri* [Govorunova et al., 2013] und insbesondere in *DsChR1* aus *Dunaliella salina* [Zhang et al., 2011] die Protonenselektivität erhöht ist.

In *CrChR2* und *C1C2* wird die Ionenselektivität vor allem durch Mutationen in Helix 2, 3 und 7 beeinflusst [Eisenhauer et al., 2012, Gaiko and Dempski, 2013, Schneider et al., 2015]. Am extrazellulären Ende von Helix 3 moduliert Q117 in *CrChR2* die Leitung verschiedener monovalenter Kationen und könnte die Dehydratisierung der geleiteten Ionen unterstützen [Gaiko and Dempski, 2013]. Im Zentrum sowie auf der intrazellulären Seite der Pore scheinen Mutationen von Ci1 die Protonenselektivität zu erhöhen und Substitution von H134 die selbige zu reduzieren, wobei in H134-Mutanten insbesondere die pH-Abhängigkeit des Gesamtphotostroms - möglicherweise aufgrund der Konkurrenz von Na^+ und H^+ um gleiche Bindungsstellen - zunimmt [Gradmann et al., 2011, Schneider et al., 2015]. Die größte Bedeutung für die Ionenselektivität von *CrChR2* hat schließlich E90/E3' im Zentrum der Pore [Eisenhauer et al., 2012, Gradmann et al., 2011, Ruffert et al., 2011]. Der Austausch von E3' durch neutrale Aminosäuren reduziert die Protonenselektivität von *CrChR2* [Ruffert et al., 2011], wohingegen eine Substitution durch die weiterhin protonierbare Asparaginsäure oder ein Histidin die Protonenselektivität erhält oder sogar erhöht [Eisenhauer et al., 2012]. Die Mutation von E3' zu einem positiv geladenen Lysin oder Arginin invertiert schließlich die Ladungspräferenz von *CrChR2* und konvertiert dieses in einen Anionkanal [Wietek et al., 2014]. Das Einfügen einer positiv geladenen Aminosäure an der Position von E3' ist hinreichend, jedoch nicht notwendig für die Generierung einer Anionenselektivität, da in Kombination mit weiteren Mutationen auch eine neutrale Substitution von E3' zu einer Anionenselektivität führt [Berndt et al., 2014] und überraschenderweise in natürlichen anionleitenden ChRs an selbiger Position eine Glutaminsäure konserviert ist [Govorunova et al., 2015].

Die unterschiedliche Präferenz von ChRs für Kationen oder Anionen wird durch eine unterschiedliche Elektrostatik der vermuteten Porenoberfläche erklärt [Berndt and Deisseroth, 2015, Kato et al., 2018]. Vergleichbar selektieren auch pentamere ligandenaktivierte Ionenkanäle (pLGIC für „pentameric Ligand Gated Ion Channel“ (engl.)) mit Hilfe geladener Reste ihrer Pore zwischen Kationen und Anionen [Jensen et al., 2005, Sine et al., 2010]. Im bakteriellen GLIC-Kanal aus *Gloeobacter violaceus* führt - ähnlich wie in *CrChR2* - die Entfernung einer negativ geladenen Glutaminsäure und das Einfügen eines positiv geladenen Arginins im Selektivitätsfilter zur Konversion des ursprünglich unspezifischen Kationkanals in einen Anionkanal [Tillman et al., 2012]. Anders als ChRs leitet jedoch GLIC neben Kationen selbst bei niedrigen pH-Wert keine Protonen (getestet wurde bis pH_e 4,0) [Bocquet et al., 2007]. Während somit die alternative Elektrostatik der Pore die Selektivität für Kationen oder Anionen erklärt, ist die molekulare Grundlage der hohen Protonenselektivität von ChRs bisher kaum verstanden.

Auch im H^+ -selektiven *DsChR1* ist E3' konserviert, dafür jedoch sowohl Ci1 als auch E4' gegen neutrale Seitengruppen ausgetauscht (siehe Abbildung A.5). In direkter Umgebung von E4' wurde durch molekulardynamische Computersimulation eine Kationenbindestelle in der geöffneten Pore von *CrChR2* postuliert [Watanabe et al., 2013]. Diese Hypothese wird gestützt durch den Einfluss von E4'-Mutationen auf den Gd^{3+} -Block des Photostroms mit einer reduzierten Blockierung des Photostroms durch Gd^{3+} in der Mutante *CrChR2* E4'Q und einer verstärkten Blockierung des Photostroms durch Gd^{3+} in der Mutante *MvChR1* A4'E [Tanimoto et al., 2013, Watanabe et al.,

2016]. Überraschenderweise ändert sich jedoch die Ionenselektivität von CrChR2 nach Substitution von E4' durch ein Alanin kaum und ausschließlich die Kanalleitfähigkeit scheint reduziert zu werden [Ruffert et al., 2011, Sugiyama et al., 2009]. Eine detaillierte Untersuchung der molekularen Bestimmungsfaktoren der Protonenselektivität von DsChR1 wird schließlich durch dessen kleine Photoströme erschwert [Zhang et al., 2011].

Nichtsdestotrotz stellt jedoch insbesondere die hohe Protonenselektivität von ChRs mit einem Permeabilitätsverhältnis von Protonen- zu Natriumpermeabilität von $P_{H^+}/P_{Na^+} = 2 - 6 \times 10^6$ in CrChR2 [Berndt et al., 2010, Kleinlogel et al., 2011a, Nagel et al., 2003] eine der herausragendsten Eigenschaften von ChRs dar und ist deutlich höher als in anderen Kationkanälen ($P_{H^+}/P_{Na^+} \geq 5$ im Protonen aktivierten Kationkanal Asic2a [Chen and Gründer, 2007], $P_{H^+}/P_{Cs^+} = 87 - 1127$ in TRPV1 [Hellwig et al., 2004] und $P_{H^+}/P_{Na^+} = 43 - 55$ in Gramicidin A [Myers and Haydon, 1972]) und vergleichbar zu hoch selektiven Protonenkanälen wie H⁺Hv1 ($P_{H^+}/P_{Na^+} \geq 10^6$ [Decoursey, 2013, Demaurex et al., 1993, Kapus et al., 1993]) oder dem viralen M2-Kanal ($P_{H^+}/P_{Na^+} = 10^5 - 10^7$ [Chizhnikov et al., 1996, Leiding et al., 2010, Shimbo et al., 1996]).

1.5 Prinzipien der Protonenleitung und Selektivität anderer Protonenkanäle

Die Leitung von Protonen in Lösung sowie auch im Protein unterscheidet sich wesentlich von der Leitung anderer Ionen mit großer Bedeutung für mögliche Mechanismen der Protonenselektivität [Decoursey, 2003, Decoursey, 2018, Decoursey and Hosler, 2014, Wraight, 2006]. In wässriger Lösung liegen Protonen an Wasser gebunden als Hydroniumion vor. Ein durch drei Wasser hydratisiertes Hydroniumion hat die gleiche Größe wie ein hydratisiertes Na⁺ und wird als Eigenion bezeichnet. Durch fluktuierende Wechselwirkungen des Hydroniumions mit Wassermolekülen seiner Hydrathülle kommt es zur vorübergehenden Ausbildung eines Zundel-Ions, in welchem das Proton gleichzeitig durch zwei Wassermoleküle konjugiert wird, bevor es anschließend auf das angrenzende Wasser übergeht und ein neues Eigenion bildet [Markovitch et al., 2008]. Im Gegensatz zu anderen Ionen, welche mit ihrer gesamten Hydrathülle an den Wassermolekülen vorbei diffundieren, können Protonen von einem Wasser zum anderen springen. In transient ausgebildeten Wasserkabeln können dabei auch mehrere Wassermoleküle gleichzeitig übersprungen werden und die Entität des angekommenen Protons muss nicht der des ursprünglichen Protons entsprechen [Hassanali et al., 2013]. Der Mechanismus des Protonenhüpfens wird als Grotthuß-Mechanismus bezeichnet und führt zu einer fünf bis siebenfach höheren Diffusionsgeschwindigkeit von H⁺, verglichen mit K⁺ oder Na⁺ [Agmon, 1995, Cukierman, 2006, Robinson and Stokes, 2002, Wraight, 2006].

Eine Protonenleitung über die Zellmembran entlang einer kontinuierlichen Wassersäule wird durch den Gramicidin-Kanal aus *Bacillus brevis* ermöglicht [Kelkar and Chattopadhyay, 2007]. Ein Dimer kurzer Peptidsequenzen bildet hierbei einen hydrophilen Zylinder, in dessen Innenseite die Carbonylgruppen der Peptidbindungen 12 Wasser konjugieren [De-la Rosa et al., 2016]. Wie in Lösung können Protonen unter Neuausrichtung der Wasserstoffbrückenbindungen von einer Seite

zur anderen weitergereicht werden [Levitt et al., 1978, Pomès et al., 1996], wohingegen sich Kationen zusammen mit den vorhandenen Wassermolekülen durch die Pore schieben müssen. Obwohl hohe Protonenflussraten von bis zu 2×10^9 Protonen/s im Gramicidin-Kanal erreicht werden [Cukierman, 2000, DeCoursey and Hosler, 2014], können auch andere Kationen dessen hydrophile Pore passieren und die Protonenselektivität des Gramicidinkanals ist verhältnismäßig niedrig ($P_{H^+}/P_{Na^+} = 43 - 55$) [Hladky and Haydon, 1972, Myers and Haydon, 1972]. Verschiedene Mechanismen für eine höhere Protonenselektivität wurden von DeCoursey and Hosler zusammengetragen und diskutiert [DeCoursey and Hosler, 2014]: 1. Sogenannte „gefrorene Wasser“ deren Beweglichkeit durch die Porendimension stark eingeschränkt wird, könnten ausschließlich einen Grotthuß-Protonentransport erlauben, die Leitung anderer Ionen jedoch blockieren [Ramsey et al., 2010]. 2. Durch Fluktuationen der Porenstruktur könnte eine Wasserkette nur transient ausgebildet bzw. zeitlich wiederholt unterbrochen werden, sodass nur Protonen entlang der Kette springen können, wohingegen größere und langsamere Ionen zurückbleiben [Kulleperuma et al., 2013]. 3. Im Gegensatz zu klassischen Ionen haben Protonen eine flexible Hydratisierungshülle und können ihre Ladung über mehrere Wasser delokalisieren, was die Passage durch eine enge Pore definierter Hydrophobizität begünstigt [Wu et al., 2007]. 4. Gleichzeitig ist zu beachten, dass in einer Proteinumgebung ein Protonentransfer nicht nur entlang von Wassermolekülen sondern auch über polare und protonierbare Aminosäuren des Proteins erfolgen kann [Nagle and Morowitz, 1978]. Entsprechend könnte bereits die strategische Positionierung einer einzelnen polaren oder protonierbaren Seitenketten in einer räumlichen Porenverengung ausreichen, eine selektive Protonenleitung zu etablieren.

Sowohl für den M2-Kanal aus dem Influenza-A-Virus als auch für den spannungsaktivierten Protonenkanal H^+Hv1 konnte eine solche protonierbare Aminosäure in einer (vermuteten) Porenverengung identifiziert werden, welche für eine selektive Protonenleitung unabdingbar ist. Im Homotetramer des M2-Kanals ist eine zentrale Histidintetrade sowohl an der Kanalöffnung als auch an der Protonenleitung beteiligt [Venkataraman et al., 2005, Wang et al., 1995]. Die Protonierung der Histidintetrade ist hierbei unmittelbar an konformelle Änderungen gekoppelt, welche eine Weitergabe des als drittes gebundenen Protons durch ein transient geöffnetes Tryptophan-Tor an das virale Lumen ermöglichen [Thomaston et al., 2017]. Sowohl die Kanalaktivierung als auch die Sättigung der Stromamplitude erfolgen bei ähnlichen pH-Werten [Chizhnikov et al., 1996] und eine Mutation des zentralen Histidins (H37) führt zu einer dauerhaften Öffnung und erhöhten Na^+ -Selektivität des Kanals [Venkataraman et al., 2005].

In H^+Hv1 ist hingegen eine Asparaginsäure ausschlaggebend für die hohe Protonenselektivität und Mutation derselben konvertieren H^+Hv1 zu einem Anionkanal [Musset et al., 2011]. Als Selektivitätsfilter von H^+Hv1 wurde ein Asparaginsäure-Arginin-Paar vorgeschlagen, welches aufgrund einer sowohl positiven als auch negativen Ladung die Passage von Kationen und Anionen durch wechselseitige Abstoßung verhindert, wohingegen das flexiblere Hydroniumion durch die transiente Protonierung der Selektivitätsfilterasparaginsäure seine eigene Leitung fördern kann und entlang der Pore weitergereicht wird [Dudev et al., 2015]. Nach Mutation dieser Asparaginsäure verbleibt in H^+Hv1 nur das positiv geladene Arginin und die Protonenleitung ist zugunsten einer erhöhten Anionpermeabilität reduziert.

1.6 Optogenetik - Das Steuern und Beobachten von Zellen mit Licht

Vor fast 15 Jahren wurde *CrChR2* erstmals in Nervenzellen von Mäusen exprimiert und erlaubte die nicht-invasive Stimulation von Aktionspotentialen mit zellulärer Auflösung und hoher zeitlicher Präzision durch Licht, was das Forschungsfeld der Optogenetik begründete und die Neurowissenschaften revolutionierte [Boyden et al., 2005, Ishizuka et al., 2006, Li et al., 2005]. Allgemein beschreibt der Begriff Optogenetik eine wissenschaftliche Methode, in welcher Organismen genetisch verändert werden, um anschließend zelluläre Prozesse sowohl mit Licht steuern als auch durch Licht auslesen zu können [Deisseroth et al., 2006]. Als interdisziplinärer methodischer Ansatz kombiniert die Optogenetik Fortschritte der gezielten genetischen Manipulation verschiedener Organismen, der Erschließung und Entwicklung neuer lichtsensitiver Proteine sowie der technischen Applikation und Detektion von Licht im biologischen Gewebe. Die Verwendung von Licht erlaubt eine externe Kontrolle und Beobachtung der untersuchten Prozesse mit hoher zeitlicher und räumlicher Präzision und geringer Schädigung der untersuchten Zellen sowie des umliegenden Gewebes. Genetische Methoden ermöglichen es durch die Wahl des Promotors sowie der zellulären Lokalisationssequenz, den wissenschaftlichen Eingriff auf bestimmte Zellen und sogar einzelne subzelluläre Kompartimente zu beschränken. Die Anzahl beobachtbarer und steuerbarer biologischer Prozesse scheint ausschließlich durch die Diversität exprimierbarer Photorezeptoren und Photosensoren beschränkt, welche als optogenetische Werkzeuge bezeichnet werden [Rost et al., 2017, Zhang et al., 2011].

Optogenetische Sensoren antworten auf eine Änderung zellulärer Parameter wie beispielsweise des pH-Wertes, der Kalziumkonzentration oder der Membranspannung mit einer Änderung ihrer Fluoreszenz oder in selteneren Fällen ihrer Biolumineszenz [Broyles et al., 2018]. Die optogenetischen Sensoren pHluorin (superekliptisch) [Miesenböck et al., 1998, Sankaranarayanan et al., 2000] und GCaMP [Nakai et al., 2001] können auf ein mutiertes bzw. zirkular permutiertes grün fluoreszierendes Protein aus der Qualle *Aequorea victoria* zurückgeführt werden, welche im Falle von GCaMP mit einer Ca^{2+} -bindenden Calmodulindomäne und dem M13-Fragment der Myosin-Leichte-Ketten-Kinase fusioniert ist, und auf einen Anstieg der Protonen- oder Kalziumkonzentration mit einer Fluoreszenzabnahme (pHluorin) bzw. Fluoreszenzzunahme (GCaMP) antwortet. Spannungsänderungen der Membran können optogenetisch sowohl mit Hilfe eines Fusionskonstruktes aus fluoreszenten Protein(en) und einer spannungssensitiven Transmembrandomäne oder auch durch ein umfunktioniertes, vormals protonenpumpendes Rhodopsin detektiert werden [Xu et al., 2017].

Optogenetische Aktuatoren können nach ihrer Funktion in lichtgesteuerte Enzyme, lichtinduzierte Zelllokalisatoren und lichtaktivierte Ionentransporter und Kanäle unterteilt werden. Als natürliches lichtaktiviertes Enzym synthetisieren beispielsweise die zytoplasmatische Adenylylzyklase bPac aus dem Bakterium *Beggiatoa sp.* [Stierl et al., 2011] oder die membranständige Rhodopsin-guanylylzyklase *RhGC* aus dem Pilz *Blastocladiella emersonii* [Scheib et al., 2015] nach Absorption von blauem bzw. grünem Licht die sekundären Botenstoffe cAMP und cGMP, wohingegen die in rationaler Proteingestaltung entworfene LAPD bei roter Belichtung cAMP und cGMP abbaut [Gasser et al., 2014]. Die gezielte Zelllokalisation kann durch die lichtinduzierte Dimerisierung

von Photorezeptoren - wie beispielsweise dem Blaulichtrezeptor Cryptochrom 2 und der CIB1-Domäne (beide aus der Schaumkresse *Arabidopsis thaliana*) - erfolgen [Kennedy et al., 2010]. Fusioniert mit einer anpassbaren DNA-bindenden TALE-Domäne konnten Cryptochrom 2 und die CIB1-Domäne dafür verwendet werden, Transkriptionsaktivatoren oder Histoneffektoren zu bestimmten DNA-Regionen zu geleiten, um sowohl Transkriptionslevel als auch Chromatinmodifikationen mit Licht zu regulieren [Konermann et al., 2013].

Die Kontrolle von Ionenflüssen über die Zellmembran kann schließlich über lichtaktivierte Ionenpumpen und Kanäle erfolgen. Alle lichtgetriebenen Ionenpumpen sind mikrobielle Rhodopsine und bewirken - bis auf einwärtsgerichtete Protonenpumpen [Shevchenko et al., 2017] - eine Hyperpolarisierung der Membran. In Neuronen kann dadurch die Initialisierung und Weiterleitung von Aktionspotentialen inhibiert und neuronale Aktivität unterdrückt werden [Chow et al., 2010, Zhang et al., 2007]. Lichtgetriebene Ionenpumpen transportieren allerdings pro absorbiertem Photon nur eine einzelne Ladung, sodass eine hohe Proteinexpression, gute Membranlokalisation und hohe Lichtintensitäten für eine zuverlässige neuronale Inhibition benötigt werden. Licht-aktivierte Ionenkanäle leiten hingegen mehrere Ionen während ihres Photozyklus. Kation- und protonenleitende ChRs depolarisieren erregbare Zellen und können zur Auslösung von Aktionspotentialen verwendet werden [Boyden et al., 2005]. Varianten mit einer schnellen Schließkinetik ermöglichen die zeitlich präzise Auslösung von Aktionspotentialfolgen hoher Frequenz [Gunaydin et al., 2010], wohingegen langsame Varianten eine Modulation neuronaler Aktivität bei niedrigerer Belichtungsintensität erlauben [Berndt et al., 2009]. Anionenleitende ChRs bewirken aufgrund der in Neuronen meist niedrigen intrazellulären Chloridkonzentration einen Abfall des Membranwiderstandes bei nur leichter Depolarisation oder teilweise sogar Hyperpolarisation der Membranspannung [Berndt et al., 2014, 2016, Wietek et al., 2014, 2015]. Durch das Klemmen der Membranspannung auf einen Wert unterhalb des Schwellenpotentials werden wie durch Ionenpumpen Aktionspotentiale unterdrückt¹².

Optogenetische Untersuchungen komplexer biologische Systeme erfordern es, verschiedene biologische Prozesse sowie unterschiedliche Zelltypen unabhängig voneinander anregen und beobachten zu können. Sowohl die Breite als auch die Überlappung der Aktionsspektren verschiedener Rhodopsine stellen hierbei eine wesentliche Hürde für die unabhängige Manipulation der Membranspannung dar. Auch die Einzelkanalleitfähigkeit sowie die Ionenselektivität als optogenetische Werkzeuge verwendeter ChRs fallen weit hinter der Effizienz und Spezifität anderer neuronaler Kanäle zurück und alternative Ansätze, Ionenkanäle durch Licht zu aktivieren, sind von großem Interesse.

1.7 Die Kanalrhodopsine Chrimson und CsChR

Für optogenetische Experimente im lebenden Tier sowie zukünftige medizinische Anwendungen sind insbesondere rotlichtsensitive Proteine gefragt. Im tierischen Gewebe öffnet sich zwischen

¹²Bei erhöhter intrazellulärer Chloridkonzentration, wie sie in axonalen Termini von Neuronen oder auch in Cardiomycyten auftritt, können anionenleitende ChRs hingegen auch die Membranspannung über das Schwellenpotential hinaus depolarisieren und Aktionspotentiale auslösen [Kopton et al., 2018, Mahn et al., 2016, Malyshev et al., 2017].

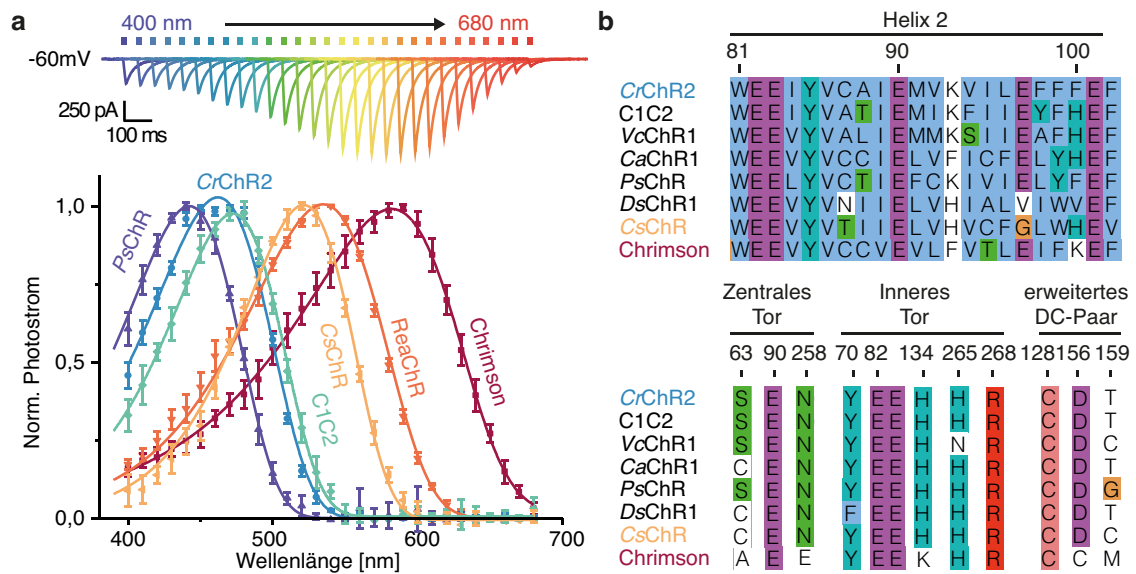


Abbildung 1.7: Verschiedene Kanalrhodopsine aus Chlorophyten Algen. (a) Aktionspektren der Photoströme verschiedener ChRs in HEK293-Zellen bei $pH_{i/e}$ 7,2 und -60 mV. Oben: Die Photoströme einer Chrimson exprimierenden HEK293-Zelle bei Anregung mit 10 ms-Lichtpulsen unterschiedlicher Wellenlänge jedoch gleicher Photonendichte. (b) Sequenzvergleich verschiedener ChRs in Helix 2 (oben) oder ausgewählten Strukturmotiven nach C1C2 (unten).

650 nm und 900 nm ein spektrales Fenster größerer Eindringtiefen für das Anregungslicht, in welchem sowohl die Absorption natürlicher Farbstoffe wie Hämoglobin als auch die Absorption von Wasser niedrig sind [Weissleder, 2001]. Bei ausreichender Lichtsensitivität der verwendeten Photorezeptoren erlaubt rotes Licht sogar eine Anregung durch die Schädeldecke einer Maus, wodurch auf die Implantation eines Lichtleiters oder eines kranialen Fensters verzichtet werden kann [Chuong et al., 2014]. Weiterhin ist in Verhaltensexperimenten eine Anregung jenseits der optischen Sensitivität visueller Photorezeptoren der Versuchstieres erstrebenswert, was ausschließlich bei Anregung mit rotem Licht gegeben ist [de Salomon and Spatz, 1983, Peirson et al., 2018].

Obwohl *CrChR2* bis 2015 das am meisten verwendete ChR darstellte [Wietek and Prigge, 2016], ist dessen Präferenz für blaues Licht (von 470 nm) sowie dessen ausgeprägte Inaktivierung unter längerer Belichtung [Nagel et al., 2003], für viele optogenetische Experimente nicht optimal geeignet. Als erstes rotverschobenes ChR wurde *VcChR1* aus der Alge *Volvox carteri* beschrieben [Zhang et al., 2008], dessen Expression und Photostromamplitude durch den Austausch ganzer Transmembransegmente in den Chimären C1V1 [Yizhar et al., 2011] und ReaChR [Lin et al., 2013] verbessert werden konnte¹³, ohne jedoch die Proteinabsorption wesentlich weiter rot zu verschieben ($\lambda_{max} = 535$ nm für *VcChR1* [Zhang et al., 2008], $\lambda_{max} = 539$ nm für C1V1 [Prigge et al., 2012] und $\lambda_{max} = 532$ nm für ReaChR [Krause et al., 2017]). Die weitere Analyse des Transkriptomts verschiedener Algen erlaubte schließlich die Identifizierung von mehr als sechzig potentiellen Kanalrhodopsingenen, von welchen 50 getestet und 25 eine elektrische Aktivität

¹³C1V1 enthält hierbei den N-Terminus sowie die ersten beiden Transmembranhelices von *CrChR1* bis vor oder nach der ersten extrazellulären Schleife zwischen Helix 2 und 3 sowie Helices 3-7 aus *VcChR1* [Prigge et al., 2012]. ReaChR besteht ebenfalls im Wesentlichen aus *VcChR1* mit dem N-Terminus und Teilen aus Helix 1 aus *CrChR1*, Helix 6 aus *VcChR2* und der zusätzlichen Mutation L171I in Helix 3 [Lin et al., 2013].

in HEK293 Zellen zeigten [Johnson et al., 2012, Klapoetke et al., 2014]. Ein einziges ChR aus der Alge *Chlamydomonas noctigama* konnte auch durch Licht von 660 nm aktiviert werden und wurde Chrimson genannt. Mit einem Maximum des Aktionsspektrums von 585 nm ist Chrimson mehr als 40 nm weiter rotverschoben als alle bisher beschriebenen ChRs (Abb. 1.7 a). Selbst wiederholte Runden gerichteter Evolution, unterstützt durch maschinelles Lernen konnten selbst unter Berücksichtigung der Chrimson-Sequenz keine weitere Rotverschiebung der Proteinabsorption erzielen [Bedbrook et al., 2017a, 2019]. Schließlich ermöglicht Chrimson als nahezu einziges ChR die gleichzeitige Verwendung von blaulichtaktivierten optogenetischen Werkzeugen [Klapoetke et al., 2014], wobei jedoch auch für Chrimson aufgrund der verbleibenden Blaulichtsensitivität Lichtintensitäten sorgfältig abgestimmt werden müssen. Aktuell stellt Chrimson insbesondere in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* das ChR „of first use“ dar [Simpson and Looger, 2018] und wird seit 2018 als zweites ChR in klinischen Studien am Menschen getestet¹⁴, um in der Zukunft Erblindungserkrankungen behandeln zu können.

Die Chrimson-kodierende Süßwasseralge *Chlamydomonas noctigama* wurde ursprünglich in russischen Sümpfen beschrieben [Guiry and Guiry, 2017, Pascher, 1927]. Während in klaren Gewässern blaues Licht die größten Eindringtiefen zeigt, ist die Transmission von trüben, flachen Gewässern deutlich rotverschoben [Luria and Kinney, 1970] und könnte die Evolution eines rotverschobenen Photorezeptors zur Phototaxis begünstigt haben. Bemerkenswerterweise sind in Chrimson zentrale Aminosäuren des Inneren Tores, Zentralen Tores und der äußeren Pore aus CrChR2 nicht konserviert (Abb. 1.7 b). Auch der vermeintliche Protonendonor D156 aus CrChR2 ist im DC-Paar von Chrimson durch ein weiteres Cystein ausgetauscht. Ungeachtet der optogenetischen Bedeutung von Chrimson lassen sich entsprechend Struktur-Funktions-Prinzipien anderer ChRs nur beschränkt auf Chrimson übertragen und obwohl Chrimson in Zukunft zunehmend optogenetische Verwendung finden könnte, ist es mechanistisch bisher kaum verstanden.

Schließlich beschreiben Klapoetke et al. mit CsChR aus der Alge *Chloromonas subdivisa* ein weiteres ChR mit guter Membranexpression und großen Photoströmen in HEK293-Zellen, welches in der Helix 2 interessante Homologien zu DsChR1 zeigt. Genau wie in DsChR1 ist in CsChR K93 aus CrChR2 durch ein Histidin substituiert und E4' durch eine neutrale Aminosäure ersetzt. Sollte sich entsprechend der homologen Helix 2 eine ähnliche Protonenselektivität für CsChR wie für DsChR1 bestätigen, dann wäre CsChR aufgrund der größeren Photoströme besonders für die Untersuchung der Protonenselektivität von ChRs geeignet.

¹⁴Beschrieben als Projekt GS030 der Firma GeneSight Biologics (Paris, Frankreich) mit dem Patent „WO 2017/187272 A1“ soll das Fusionskonstrukt ChrimsonR-td-Tomato zur Behandlung der Erkrankung Retinitis Pigmentosa verwendet werden.

2 ZIELSETZUNG

Kanalrhodopsine (ChRs) ermöglichen es photosynthetisch aktiven Algen, sich bezüglich der herrschenden Lichtverhältnisse auszurichten, und erlauben als optogenetische Werkzeuge in Gastzellen, zelluläre und subzelluläre Ionenflüsse durch Licht zu kontrollieren [Zhang et al., 2011]. In der Grundlagenforschung können mit Hilfe von ChRs lebenswichtige Prozesse wie die selektive und zeitlich genau regulierte Leitung von Kationen, Anion und Protonen in einem einzelnen Protein sowohl spektroskopisch als auch elektrophysiologisch untersucht werden. Im Gegensatz zu anderen Ionenkanälen kann hierbei das Kanalöffnen und Schließen mit Hilfe des kovalent gebundenen Chromophor sowohl im isolierten Protein als auch in der Zellmembran ausgelöst und für eine synchron aktivierte Proteinpopulation betrachtet werden. Geleitet werden von den meisten ChRs vorrangig Protonen, welche auch bei physiologisch niedriger Konzentration wesentlich zum Gesamtphotostrom beitragen [Schneider et al., 2015]. Während eine unterschiedliche Elektrostatik der Porenoberfläche die Selektivität von ChRs für Kationen und Anionen erklärt [Berndt et al., 2016, Kato et al., 2018], ist die hohe Protonenselektivität von ChRs bisher kaum verstanden und wurde fast ausschließlich für *CrChR2* unter Dauerlicht untersucht. Unter Dauerlicht inaktiviert der Photostrom von *CrChR2* [Nagel et al., 2003] und ändert dabei seine Protonenselektivität [Berndt et al., 2010], was in optogenetischen Anwendungen hoher Belichtungsfrequenz eine wesentliche Hürde darstellt und ebenfalls molekular bisher kaum verstanden ist. Neu entdeckte ChRs unterscheiden sich schließlich in der Aminosäuresequenz und dem strukturellen Aufbau wichtiger Struktur motive wesentlich von bisher charakterisierten ChRs [Govorunova et al., 2017a, Klapoetke et al., 2014] und sind gleichzeitig - wie das mit einem Aktionsmaximum von 585 nm einzigartig rotverschobene Chrimson - von großem optogenetischen Interesse.

Mit einem besonderen Fokus auf *CrChR2* und Chrimson soll in folgender Arbeit die Ausprägung, der zeitlich Verlauf, die unmittelbare Wirkung und die molekulare Grundlage der Protonenleitung und Protonenselektivität von ChRs untersucht werden. Ziel ist es hierbei, die Protonenselektivität verschiedener ChRs zu vergleichen, die molekularen Bestimmungsfaktoren der hohen Protonenselektivität von ChRs proteinübergreifend zu identifizieren, die zeitliche Entwicklung verschiedener protonenleitender Zustände elektrophysiologisch zu beschreiben und mechanistische Besonderheiten protonenleitender ChRs zu erklären - wie die Rotlichtabsorption und das auch ohne DC-Paar schnelle Kanalschließen von Chrimson. Zeitaufgelöste Photostrom- und Ionen selektivitätsmessungen nach Anregung durch einen Laserblitz sollen einen direkten Vergleich elektrophysiologischer und spektroskopischer Messungen ermöglichen und zur Entwicklung methodenübergreifender Photozyklusmodelle für die hier untersuchten ChRs führen.

Während die in Kooperation mit dieser Arbeit gelöste Kristallstruktur des dunkeladaptierten Chrimson [Oda et al., 2018] eine strukturelle Einordnung der elektrophysiologisch identifizierten Funktions motive ermöglicht, können die mechanistischen Erkenntnisse für die Entwicklung neu-

er optogenetischer Werkzeuge genutzt werden. Weiterhin gefragt sind rotlichtaktivierte Kanäle schneller und langsamer Kinetik, erhöhter Natriumselektivität und weiter rotverschobener Absorption beziehungsweise reduzierter Blaulichtaktivität. Während eine weitere Rotverschiebung der Lichtabsorption, die unabhängige Anregung unterschiedlicher Photorezeptoren im selben Experiment ermöglicht, kann eine Reduktion der Protonenleitfähigkeit helfen, lokale pH-Wert-Änderungen zu minimieren und unerwünschte Seiteneffekte zu verhindern. Neue optogenetische Funktionalitäten sollen sowohl durch den gezielten Austausch einzelner Aminosäuren der hier untersuchten ChRs als auch durch die geschickte Kombination unterschiedlicher Proteine als Zwei-Komponenten-Optogenetik erschlossen werden.

3 METHODEN

Die untersuchten Proteine und Fusionskonstrukte wurden mit Hilfe standardisierter molekularbiologischer Protokolle in spezielle Expressionsplasmide kloniert, über ortsgerichtete Mutagenese modifiziert, in *E.coli* amplifiziert und - falls erforderlich - *in vitro* transkribiert. Die heterologe Expression in Oozyten des Krallenfrosches *Xenopus laevis* sowie humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293) erlaubte eine elektrische Charakterisierung mit Hilfe von „Two-Electrode-Voltage-Clamp“- (TEVC) sowie „Whole-Cell-Patch-Clamp“-Messungen unter Variation der extra- sowie (in HEK-Zellen) auch intrazellulärer Ionenzusammensetzung und unter Verwendung unterschiedlicher Belichtungsprotokolle. Die Lokalisation der exprimierten und mit einem fluoreszierenden Protein fusionierten Konstrukte innerhalb der Zelle konnte über konfokale Fluoreszenzmikroskopie erfasst werden. Bildgebende Verfahren mit Hilfe der kommerziell verfügbaren Fluoreszenzfarbstoffe FURA-2 und BCECF sowie des genetisch kodierten pH-sensitiven fluoreszenten Proteins pHluorinSE ermöglichten eine spezifische Erfassung lokaler Änderungen der Kalzium- und Protonenkonzentration. In der methylothropen Hefe *Pichia pastoris* exprimiertes Protein konnte über Affinitätschromatographie für absorptionsspektroskopische Untersuchungen aufgereinigt werden. Die abschließende Auswertung der Daten erfolgte mit ClampFit, Excel, Origin9.1 und Matlab. Eine Liste der verwendeten Geräte, Chemikalien und Zelllinien findet sich unter Angabe des Herstellers und des Verwendungszweckes im Anhang (siehe Tabelle A.8 bis Tabelle A.16).

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Verwendete Gene und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten und modifizierten Gene sind zusammen mit den sie ursprünglich enthaltenden Vektoren sowie ihrer Quelle in Tabelle 3.1 zusammengefasst. Die Expressionsplasmide sind unter Angabe der verwendeten Promotoren, der kodierten Antibiotikaresistenz sowie ihres Verwendungszwecks in Tabelle 3.2 angegeben.

3.1.2 Vermehrung von Expressionsplasmiden in *E.coli*

Die Vermehrung der verwendeten Plasmide erfolgte mit Hilfe chemokompetenter *E.coli* XL1 blue Zellen unter Verwendung der in Tabelle 3.3 gegebenen Medien.

Erstellung chemokompetenter *E.coli* Zellen. Die Vorbereitung chemokompetenter Zellen erfolgte ähnlich wie bei Green and Rogers [2013] beschrieben. X11blue *E.coli* Zellen wurden auf einer Tetracyclin (12,5 µg/ml) enthaltenen LB-Agarplatte ausgestrichen, über Nacht bei 37 °C inkubiert und anschließend zum Animpfen einer 4 ml LB-Vorkultur verwendet. Die am Folgetag

Gen	Plasmid	Erhalten von	Referenz
hCrChR2	pmCherry	F. Schneider-Warme	[Nagel et al., 2003, Schneider et al., 2013]
CsR T46N	pGEM	Arend Vogt	[Vogt et al., 2015, Zhang et al., 2011]
CsR T46N	peGFP-N1	Arend Vogt	[Vogt et al., 2015]
Glic- α GlyR	pMT3	Pierre-Jean Corringer	[Duret et al., 2011]
C1C2	PIC-C	Katja Stehfest	[Hontani et al., 2017, Lin et al., 2009]
P _s ChR2	pmCherry	Jonas Wietek	[Govorunova et al., 2013, Wietek et al., 2017]
CsChR	pmCherry	Jonas Wietek	[Klapoetke et al., 2014]
C1V1	pECFP-N1	F. Schneider-Warme	[Yizhar et al., 2011]
GlicT	pTLN	Tommy Tillmann	[Tillman et al., 2012]
rAsic1a	pRSS6009	Kyoko Atsuta-Tsunoda	[Ferenczi et al., 2016]
rAsic2a	pRSS6009	Kyoko Atsuta-Tsunoda	[Ferenczi et al., 2016]
rAsic3	pRSS6009	Kyoko Atsuta-Tsunoda	[Ferenczi et al., 2016]
ReaChR	pECFP-C1/ pmCerulean3.0	Christiane Grimm	[Krause et al., 2017, Lin et al., 2013]
CrChR2-eYFP- β HK-NpHR	pCDNA3.1(-)	F. Schneider-Warme	[Kleinlogel et al., 2011b]
P2A	synthetisiertes Oligonukleotid	IDT	[Szymczak-Workman et al., 2012]
Chrimson	pmCerulean	Christiane Grimm	[Klapoetke et al., 2014, Vierock et al., 2017]
CsChrimson	lentiviraler Vektor	Ed Boyden	[Klapoetke et al., 2014, Vierock et al., 2017]
C1Chrimson	pmGFP	Osamu Nureki	[Oda et al., 2018]
pHluorin_SE	pmKate	F. Schneider-Warme	[Rost et al., 2015]
iC++	pmCherry	Jonas Wietek	[Berndt et al., 2016]
Aurora	pmCherry	Jonas Wietek	[Wietek et al., 2017]
GtACR1	pmCherry	Johannes Oppermann	[Govorunova et al., 2015, Wietek et al., 2016]
GtACR2	pmCherry	Jonas Wietek	[Govorunova et al., 2015, Wietek et al., 2016]

Tabelle 3.1: Verwendete Gene sowie das sie ursprünglich enthaltende Plasmid und der physikalische Ursprung der DNA-Probe. Die Referenz benennt die das Ursprungsstruktur beinhaltende Publikation.

Plasmid	Promotor	Resistenz	Verwendung
pGEM	T7	Ampicillin	<i>in vitro</i> Transkription
peGFP-N1	CMV	Kanamycin	Heterologe Expression in HEK293
peCFP-C1	CMV	Kanamycin	Heterologe Expression in HEK293
pmCerulean3.0-C1	CMV	Kanamycin	Heterologe Expression in HEK293
pmCherry	CMV	Kanamycin	Heterologe Expression in HEK293
pcDNA3.1 (-)	CMV, T7	Ampicillin	Heterologe Expression in HEK293
pPICZ-C	AOX1	Zeocin	Heterologe Expression in <i>Pichia pastoris</i>

Tabelle 3.2: Verwendete Plasmide unter Angabe des enthaltenen Promotors, der Antibiotikaresistenz sowie des experimentellen Verwendungszweckes.

Puffer	Zusammensetzung	Anmerkung
LB Medium	10 g/l Trypton; 5 g/l Hefe Extrakt; 10 g/l NaCl; in ddH ₂ O bei pH 7,5	Für Agarplatten wurden außerdem 10 g/l Agar hinzugefügt. Bei der Verwendung von Zeocin wurde der Salzgehalt auf 5 g/l NaCl reduziert. Autoklaviert.
Tfb1 Puffer	30 mM Kaliumacetat; 100 mM RbCl; 2 mM CaCl ₂ ; 50 mM MnCl ₂ ; 15% v/v Glycerin; in ddH ₂ O bei pH 5,8	steril filtriert
Tfb2 Puffer	10 mM MOPS; 10 mM RbCl; 75 mM CaCl ₂ ; 15% v/v Glycerin; in ddH ₂ O bei pH 6,8 (mit KOH)	steril filtriert
TAE Puffer	40 mM TRIS; 20 mM Acetat; 1 mM EDTA; pH 8,5	Angesetzt als 50x Lösung

Tabelle 3.3: Puffer- und Nährlösung zur Vermehrung und Modifikation der Expressionsplasmide

angepflegte *E.coli* Hauptkultur wurde bis zu einer optischen Dichte von 0,5 bei 600 nm hochgewachsen gelassen und anschließend bei 3000 g und 4 °C für 10 min in einer Zentrifuge pelletiert. Das Zellpellet wurde in Tfb1 resuspendiert (15 ml Tfb1 pro 100 ml *E.coli* Kultur) und erneut bei 3000 g zentrifugiert. Das mit Tfb1 gewaschene Zellpellet wurde nun in Tfb2 gelöst (1 ml Tfb2 pro 100 ml *E.coli* Kultur) in Eppendorfgefäße aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei –80 °C aufbewahrt.

Transformation und DNA-Präparation Die Transformation chemokompetenter *E.coli* Zellen mit Plasmid-DNA erfolgte mittels Hitzeschock [Cohen et al., 1972]. Kompetente *E.coli* Zellen wurden im Verhältnis 1:1 mit 0,1 mM CaCl₂ und 40 ng Plasmid-DNA für 15 min bei 4 °C inkubiert, für 1 min einer Temperatur von 42 °C ausgesetzt und anschließend erneut für 5 min auf Eis gekühlt. Nach der Zugabe von LB-Medium wurden die Zellen für 1 h bei 37 °C geschüttelt, anschließend auf Agarplatten des dem transformierten Plasmids entsprechenden Antibiotikums ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Antibiotikakonzentrationen entsprachen hierbei 30 µg/ml Kanamycin, 100 µg/ml Ampicillin oder 25 µg/ml Zeocin.

Am Folgetag wurden einzelne Kolonien zur Inokulation antibiotikaversetzter LB-Medien verwendet. Diese wurden daraufhin bis zu 30 h bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Die enthaltene Plasmid-DNA konnte abschließend mit Hilfe der kommerziell erhältlichen Kits Nucleospin[®] Plasmid Easy-Pure, NucleoBond[®] Xtra Midi Plus oder Nucleobond[®] Xtra Maxi Plus nach den Herstellerangaben extrahiert und photometrisch bezüglich ihrer Konzentration quantifiziert werden. Die Sequenzierung veränderter DNA-Abschnitte erfolgte extern durch professionelle Sequenzierungsdienstleister (i.d.R. LGC Genomics).

3.1.3 Genetische Modifikation von Plasmid DNA

Das Einfügen von Genen in bestimmte Expressionsvektoren sowie die Kombination verschiedener Genfragmente erfolgte durch Restriktionsverdau und anschließende Ligation der DNA-Fragmente [Cohen et al., 1973]. Ortsgerichtete Mutagenese ermöglichte die Generierung einzelner Punktmutanten [Bachman, 2013].

Primerdesign und Polymerasekettenreaktion. Die Amplifikation zu klonierender Genabschnitte sowie der Austausch einzelner Basenpaare in der ortsgerechten Mutagenese erfolgte mittels einer Polymerasekettenreaktion [Mullis et al., 1986]. DNA-Oligonukleotide als Primer wurden mit Hilfe der Software Gentle entworfen und bei Anbietern professioneller Gensynthese (i. Allg. IDT-Integrated DNA Technology) hergestellt. Primer für die Klonierung bestimmter Genabschnitte waren komplementär zu den Flanken des zu klonierenden Genabschnittes und enthielten Restriktionsschnittstellen für das Zielplasmid. Primer zur Ortsgerichteten Mutagenese wurden komplementär zum Ausgangsplasmid mit einzelnen Fehlpaarungen in den zu mutierenden Codons entworfen. Die Anlagerungstemperatur der verwendeten Primer T_M lag zwischen 52 °C und 62 °C und i.d.R. höher als die mittlere Temperatur ihrer Sekundärstrukturbildungen¹. Die Zusammensetzung

¹Die Anlagerungstemperatur wurde online mit Hilfe von bioph.org berechnet. Potentielle Sekundärstrukturen der entworfenen Primer wurden mit Hilfe des mfold Internetservers bestimmt [Zuker et al., 1999].

Reaktion	Volumen	Komponente	Konzentration
PCR	1 µl	Plasmid-DNA	40 ng/µl
	1 µl	Primer 1 (vorwärts)	10 µM
	1 µl	Primer 2 (rückwärts)	10 µM
	5 µl	Pfu-Reaktionspuffer	10xPuffer
	5 µl	dNTPs	2 mM
	1 µl	Pfu-DNA-Polymerase	2,5 U/µl
	36 µl	ddH ₂ O	
Restriktions- verdau	1 µg	DNA (Plasmid oder DNA-Fragment)	
	1 µl	FastDigest-Restriktionsenzym 1	
	1 µl	FastDigest-Restriktionsenzym 2	
	1 µl	Alkaline Phosphatase (nur für den Zielvektor)	
	2 µl	FastDigest-Puffer	10xPuffer
	Auffüllen bis 20 µl	ddH ₂ O	
Ligation	2 µl	Plasmid DNA	~50 ng/µl
	6 µl	Fragment DNA	~50 ng/µl
	2 µl	T4-Ligase Puffer	10xPuffer
	1 µl	T4-Ligase	
	9 µl	ddH ₂ O	
Linearisierung für Transkription	3 µg	pGEM-Vektor	
	2 µl	NheI FastDigest Restriktionsenzym	
	3 µl	FastDigest Reaktionspuffer	10xPuffer
	Auffüllen bis 30 µl	ddH ₂ O	
Linearisierung für Transformation in <i>Pichia pastoris</i>	10 µg	pPIC-C Vector	
	15 µl	MssI FastDigest Restriktionsenzym	
	10 µl	FastDigest Reaktionspuffer	10xPuffer
	Auffüllen bis 100 µl	ddH ₂ O	
Transkription	1 µg	linearisierter pGEM-Vektor	
	15 µl	NTP/CAP-Mix	2xKonzentrat
	3 µl	Reaktionspuffer	10xPuffer
	2 µl	T7/SP6 Enzym Mix	
	Auffüllen bis 30 µl	ddH ₂ O	

Tabelle 3.4: Reaktionsansätze für die ortsgerichtete Mutagenese, DNA-Klonierung, Linearisierung und in vitro Transkription

PCR-Schritt	Temperatur	Dauer	
1	95 °C	5 min	
2	95 °C	30 s	Wiederhole Schritt 2-4 19-29x
3	T _M -3 °C	20 s	
4	72 °C	2 min-10 min	
5	72 °C	10 min	
6	4 °C		

Tabelle 3.5: PCR-Protokoll für die Klonierung und ortsgerichtete Mutagenese Schritt 1 zur Aktivierung der Polymerase, Schritt 2 zur Denaturierung der DNA-Doppelstränge, Schritt 3 zur Anlagerung der Primer, Schritt 4 für die Elongation des PCR-Produktes, Schritt 5 zur abschließenden Synthese unvollendeter DNA-Stränge und Schritt 6 zur Unterbindung weiterer DNA-Synthese. Die Anlagerungstemperatur und Elongationsdauer wurde entsprechend der Primer und erwarteten Länge des PCR-Produktes entsprechend 1 min/kb angepasst. Für die ortsgerichtete Mutagenese wurden 19 - 24 und für die Klonierung von DNA-Abschnitten 24 - 29 Zyklen der Schritte 2 - 4 durchlaufen.

eines Standardreaktionsansatzes sowie das verwendete Temperaturprotokoll für die Polymerasekettenreaktion finden sich in Tabelle 3.4 und Tabelle 3.5.

Fortsetzung ortsgerichtete Mutagenese. Für die ortsgerichtete Mutagenese wurde zum Verdau des parentalen Ausgangsplasmids 1 µl des methylierungsspezifischen Restriktionsenzym DpnI zum PCR-Reaktionsansatz dazugegeben, dieser für 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend 15 µl des DpnI behandelten PCR-Ansatzes für die Transformation von *E.coli* XL1blue verwendet (siehe Abschnitt 3.1.2).

Fortsetzung Klonierung. Das zu klonierende PCR-Produkt wurde mittels Gelelektrophorese bei 120 V von der ursprünglichen Plasmid DNA getrennt und mit Hilfe des NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kits aufgereinigt. Verwendet wurde ein 1%-iges TAE-Agarose Gel mit dem DNA-Marker O'GeneRuler DNA Ladder, dem FastDigest Green Ladepuffer und dem DNA-Farbstoff SYBR Green zur Visualisierung der DNA-Banden. Anschließend wurden sowohl das zu klonierende DNA-Fragment als auch der Zielvektor entsprechend Tabelle 3.4 für 1 h bei 37 °C durch Restriktionsenzyme verdaut, die erzeugten DNA-Fragmente über erneute Gelelektrophorese getrennt und mit Hilfe des NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kits aufgereinigt. DNA-Fragment und Zielplasmid wurden zu einem Ligationsansatz entsprechend Tabelle 3.4 zusammen pipettiert, für 30 min bei 23 °C inkubiert und anschließend 15 µl des Ligationsansatzes in *E.coli* XL1 blue Zellen transformiert (siehe Abschnitt 3.1.2).

3.1.4 *In vitro* RNA-Synthese

Für die *in vitro* RNA-Synthese wurde der das Rhodopsin kodierende Vektor durch einen Restriktionsverdau mit den Enzymen NheI für pGEM-Vektoren und MluI für pRSS6009-Vektoren hinter dem zu transkribierenden Gen linearisiert. Der Reaktionsansatz findet sich in Tabelle 3.4 und wurde für 2 h bei 37 °C inkubiert. Die linearisierte DNA wurde mit dem NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit aufgereinigt und für die RNA-Transkription mit Hilfe des T7/SP6 mMessenger mMashine® Kits entsprechend Tabelle 3.4 eingesetzt. Die synthetisierte RNA wurde durch Zugabe von 30 µl ddH₂O und 30 µl LiCl, Inkubation bei –20 °C über Nacht sowie anschließender Zentrifugation bei 16 000 g für 30 min bei 2 °C gefällt und mit 70%-igen Ethanol sowie erneuter Zentrifugation (16 000 g, 15 min, 2 °C) gereinigt. Das gewonnene RNA-Pellet wurde bei geringer Hitze vakuumgetrocknet und in 10 µl ddH₂O gelöst. Die Reinheit und Konzentration der RNA wurden über Gelelektrophorese überprüft und photometrisch bestimmt.

3.2 Heterologe Expression von Membranproteinen

Die heterologe Expression der untersuchten Konstrukte erfolgte für „Two-Electrode-Voltage-Clamp“-Experimente in *Xenopus laevis* Oozyten [Gurdon et al., 1971]. Für „Whole-Cell-Patch-Clamp“-Messungen, zur Lokalisation der Proteinexpression durch konfokale Mikroskopie und für die zeitaufgelöste Bildgebung ionaler Konzentrations- und pH-Änderungen wurden humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293-Zellen) verwendet [Graham et al., 1977]. Für die Proteinexpression

Puffer	Zusammensetzung	Anmerkung
ORI-Puffer	96 mM NaCl; 5 mM KCl; 1 mM MgCl ₂ ; 2 mM CaCl ₂ ; 5 mM MOPS; in ddH ₂ O bei pH 7,5	Für Expression mikrobieller Rhodopsine wurden 50 U/l Penicillin und 0,05 mg/l Streptomycin sowie 1 µM all- <i>trans</i> Retinal hinzugegeben.
YPD-Medium	10 g Hefeextrakt; 20 g Pepton; 20 g Glukose; auf 1 l mit ddH ₂ O	Für die Erstellung von Agarplatten mit 20 g BactoAgar komplementiert
YPDS-Medium	10 g Hefeextrakt; 20 g Pepton; 182,2 g Sorbitol; 20 g Glukose; auf 1 l mit ddH ₂ O	Für die Erstellung von Agarplatten mit 20 g BactoAgar komplementiert.
BMGY-Medium	10 g Hefeextrakt; 20 g Pepton; 1,34% YNB; 1% Glycerol; 1x BME Vitamine; 100 mM Posphatpuffer bei pH 6,0; in 1 l ddH ₂ O	
BMMY-Medium	10 g Hefeextrakt; 20 g Pepton; 1,34% YNB; 2,5% Methanol; 1x BME Vitamine; 100 mM Posphatpuffer bei pH 6,0 in 1 l ddH ₂ O	Für die Expression mikrobieller Rhodopsine wird 6 µM all- <i>trans</i> Retinal hinzugegeben.

Tabelle 3.6: Zusammensetzung der Puffer und Medien für die heterologe Proteinexpression

zur Proteinaufreinigung und anschließende Absorptionsspektroskopie wurde auf die Hefe *Pichia pastoris* zurückgegriffen [Cregg et al., 1985].

3.2.1 Heterologe Expression von Membranproteinen in *Xenopus laevis* Oozyten

Oozyten wurden im Reifestadium IV-VI operativ aus *Xenopus laevis* Froschweibchen entnommen, aus den Ovarien entfernt, mit Kollagenase behandelt und mit Glaspipetten mechanisch aus ihren Ovarialfollikeln befreit². Mit Hilfe eines Mikroinjektors und einer durch Glasbruch geschärften spitzen Borosilikatpipette wurden 32 ng RNA (siehe Abschnitt 3.1.4) in frische Oozyten injiziert und diese einzeln in einer 96-Multikammerplatte für 3-5 Tage bei 18 °C in antibiotika- und retinal-versetztem ORI (siehe 3.6) inkubiert.

3.2.2 Heterologe Expression von Membranproteinen in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK-Zellen)

Für die heterologe Expression in humanen Zellen wurden HEK293 Zellen von Sigma-Aldrich und dem Leibniz-Institut „Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH“ (DSMZ) erworben. Die Expression von CrChR2-YFP erfolgte mit einer stabil transfizierten HEK293-Zelllinie [Feldbauer et al., 2009].

Poly-D-Lysin-Beschichtung als Vorbereitung der Messdeckgläschen Zur Verbesserung der Zellqualität und Förderung einzeln isolierter Zellen wurden für elektrophysiologische Messungen benötigte Deckgläschen mit poly-D-Lysin beschichtet. Deckgläschen (ø15 mm) wurden in 1N HCl-Lösung für 72 h mit 120 rpm geschwenkt, mit ddH₂O gespült, in 95% Ethanol sterilisiert und anschließend unter der Sterilbank abgeflammt. Die abgekühlten Deckgläschen wurden für 1 h bei 150 rpm in 50 µg/ml poly-D-Lysin inkubiert, erneut mit ddH₂O gespült, auf sterilem Papier unter der Sterilbank getrocknet und abschließend durch UV-Bestrahlung für 20 min sterilisiert.

²Für die Präparation und Bereitstellung der Oozyten bedanke ich mich bei Maila Reh und Dr. Arend Vogt.

Kultivierung von HEK-Zellen Die Kultivierung der adherent in T25-Kulturflaschen wachsenden HEK293-Zellen erfolgte in DMEM supplementiert mit 10% fötalem Kälberserum (FKS) und 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin bei 37 °C und 5% CO₂. Für die stabile CrChR2-YFP Zelllinie wurde dem Nährmedium außerdem 200 µg/ml Zeocin und 50 µg/ml Blastocidin hinzugegeben. In bis zu 28 Passagen im Abstand von 3 - 4 Tagen wurden die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen und anschließend mit DMEM + 10% FKS abgespült³. Die Zelldichte wurde mit einer Neubauer-Zählkammer oder dem automatischen Zellzähler Luna bestimmt und anschließend 250 000 Zellen in einer neuen T25-Flasche zusammen mit 5 ml frischem Nährmedium (DMEM + 10% FKS + Antibiotika) ausgesät. Alternativ konnten Zellen für elektrophysiologische und fluoreszenzmikroskopische Messungen vorbereitet werden. Bis zu drei poly-D-Lysin-beschichtete Deckgläschen wurden hierfür in einer 25 mm-Petrischale platziert und 100 000 HEK-Zellen in 2 ml DMEM + 10% FKS supplementiert mit Antibiotika und 1 µM all-*trans*-Retinal ausgesät.

Transiente Transfektion und Expressionsinduktion Die transiente Transfektion der HEK293-Zellen erfolgte durch Lipofektion mit FuGene HD 28 h nach Vorbereitung der Zellen. Für eine Petrischale wurden 2 µg Plasmid-DNA mit 6 µl FuGene HD und 250 µl DMEM ohne FKS gemischt, 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend vorsichtig auf die Zellen geträufelt. Die Induktion der Expression der stabilen Zelllinie erfolgte ebenfalls 28 h nach Ansetzung der Zellen durch Hinzugabe von 0,1 µM Tetracyclin.

3.2.3 Heterologe Expression von Membranproteinen in der Hefe *Pichia pastoris*

Als Vorbereitung spektroskopischer Experimente wurde CsChrimson mit einer C-terminalen TEV-Protease-Schnittstelle sowie einem anschließenden 6xHis-tag in den pPICZ-C Vektor kloniert und im *Pichia pastoris* Stamm SMD 1168H exprimiert. Die Klonierung des Expressionsplasmides erfolgte durch Dr. Benjamin S. Krause und die Expression in *Pichia pastoris* sowie die anschließende Proteinaufreinigung wurde durchgeführt von Thi Bich Thao Nguyen nach etablierten Protokollen entsprechend des „Easy Select Pichia Expressions“-Kits sowie der Expression und Proteinaufreinigung anderer mikrobieller Rhodopsine [Bruun et al., 2011, Luck et al., 2012].

Vorbereitung linearisierter DNA und kompetenter *Pichia pastoris* Zellen. Als Vorbereitung der Transformation wurden 10 µg CsChrimson-pPIC-C1 Vektor-DNA entsprechend des Reaktionsansatzes aus Tabelle 3.4 für 40 min bei 37 °C linearisiert und nach Zugabe von 50 µl 3 M NaAcetat (pH 5,2), 350 µl ddH₂O und 500 µl Isopropanol für 20 min bei –80 °C inkubiert und anschließend durch Zentrifugation (16000 g, 2 °C, 20 min) gefällt. Das DNA-Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, vakuumgetrocknet und anschließend in 10 µl ddH₂O resuspendiert. Zur Generierung kompetenter *Pichia pastoris* Zellen wurden 500 ml YPD-Medium mit einer über Nacht gewachsenen 5 ml Vorkultur angeimpft und bei 30 °C und 180 rpm bis zu einer optischen

³Das Ablösen der Zellen konnte durch Zugaben von 0,7 ml Trypsin TripleX und anschließender Inkubation für 2 min bei 37 °C unterstützt werden. Allerdings mussten hierbei in einem zusätzlichen Waschschrift mit DMEM+10% FKS durch Zentrifugation für 3 min bei 500 g und Verwerfung des Überstandes Trypsinrückstände entfernt werden.

Dichte von $OD_{600} = 1,3-1,6$ bei 600 nm wachsen gelassen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 1500 g und 4 °C für 5 min geerntet und durch etappenweises vorsichtiges Resuspendieren und Pelletieren erst in 500 ml eiskaltem ddH₂O, dann in 250 ml eiskaltem ddH₂O, anschließend in 20 ml eiskaltem 1 M Sorbitol und abschließend in 1 ml 1 M Sorbitol-Lösung stückweise gewaschen, aufkonzentriert und in Sorbitol überführt.

Transformation von *Pichia pastoris* Zellen. Für die Transformation wurden 80 µl kompetenter *Pichia pastoris* Zellen mit 10 µg linearisiertem Expressionsplasmid für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine Elektroporation in einer vorgekühlten Elektroporationsküvette mit 1500 V, 200 Ω, 25 µF für 4 ms. Unmittelbar darauf wurden die elektroporierten Zellen mit 1 ml eiskalter 1 M Sorbitol-Lösung vermennt und für 3 h bei 30 °C inkubiert.

Die Selektion transformierter Zellen erfolgte nach Ausstrich von 100 µl der transformierten Zellen auf YPDS-Agarplatten mit 100 µg/ml Zeocin und anschließender Inkubation bei 30 °C für mindestens 3 d. Die erhaltenen *Pichia pastoris* Klone wurden anschließend an definierter Position auf YPDS-Agarplatten steigender Zeocin-Konzentration (100 µg/ml, 1000 µg/ml, 2000 µg/ml) ausgestrichen und erneut für 2 d bei 30 °C inkubiert, um nur jene Klone weiterzuverwenden, die bei allen Zeocin-Konzentrationen wachsen konnten. Für die Erstellung von Cryo-Stocks wurden 10 ml YPD angeimpft und bei 30 °C und 200 rpm über Nacht bis zu einer OD_{600} von 2 - 5 kultiviert. Anschließend wurden 500 µl Übernachtskultur mit 500 µl frischem YPD-Medium supplementiert mit 30% Glycerol gemischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren sowie bei -80 °C gelagert.

Proteinexpression unter der Kontrolle des AOX1 Promotors. Die Expression von Chrimson in *Pichia Pastoris* erfolgte in drei Schritten. Die benötigte initiale Zelldichte von $OD_{600nm}=1,0$ der Hauptkultur wurde durch zwei aufeinanderfolgende Vorkulturen zunehmenden Volumens in BMGY erzielt⁴. Beide Vorkulturen wurden über Nacht bei 30 °C und 180 rpm inkubiert. Für die Hauptkultur wurde das Methanol enthaltene BMMY Medium⁵ zur Induktion der heterologen Genexpression durch den Aox1 Promotor verwendet. Die für eine initiale Zelldichte von $OD_{600nm}=1$ benötigte Zellmenge wurde der zweiten Vorkultur entnommen, durch Zentrifugation (4000 g, 15 min, 23 °C) in einem sterilisierten Behälter pelletiert und zum Animpfen der Hauptkultur in BMMY resuspendiert. Die Hauptkultur wurde für 48 h bei 30 °C und 130 rpm in Schikanenkolben geschüttelt und täglich 3 ml Methanol pro Liter hinzugegeben. Anschließend wurden die Zellen bei einer optischen Dichte von $OD_{600} = 15-18$ durch Zentrifugation (4000 g, 20 min, 4 °C) geerntet.

3.3 Elektrophysiologische Methoden

Elektrophysiologische Messungen erlauben es, elektrische Ströme über die Plasmamembran mit hoher Präzision und Zeitauflösung zu messen. Im „Voltage-Clamp“-Modus wird die Membran der

⁴In der 1. Vorkultur supplementiert mit 100 µg/ml Zeocin in der zweiten Vorkultur ohne Antibiotika.

⁵Erneut ohne Antibiotika.

Zelle auf eine feste Spannung geklemmt und der dafür zu injizierende Strom gemessen. *Xenopus laevis* Oozyten stellen ein sehr robustes Expressionssystem dar, in welchem sich die Expressionslevel koexprimierter Proteine über die Konzentration des injizierten RNA-Gemischs genau einstellen lassen und ein hoher Durchsatz elektrophysiologischer Messungen erzielt werden kann [Dascal, 2001]. Die Größe der Oozytenoberfläche und entsprechend der Transmembranströme erfordert hierfür diese separate Spannungsmessung und Strominjektion durch zwei getrennte Elektroden. In den wesentlich kleineren HEK-Zellen lassen sich dagegen mit der Patch-Clamp-Technik und der „Whole-cell“-Konfiguration Transmembranströme über die gesamte Zellmembran mit einer einzelnen Elektrode messen [Hamill et al., 1981, Neher et al., 1978]. Gleichzeitig ist das Rauschen und die Zeitauflösung verbessert und der Austausch des Zytoplasmas der HEK-Zelle mit der Pipettenlösung ermöglicht die beidseitige Kontrolle der extra- und intrazellulären Ionenbedingungen.

3.3.1 Vorbereitungen elektrophysiologischer Messungen

Die Messung ionischer Ströme in Lösung sowie über die Zellmembran erfolgte mit Hilfe von Ag/AgCl-Elektroden. Zur Vorbeugung von Spannungsschwankungen wurden für die Referenz- und Badelektroden zusätzlich Agarbrücken verwendet.

Silberchloridelektroden und Agarbrücken Für die Präparation der Ag/AgCl Elektroden wurden Silberdrähte unterschiedlichen Durchmessers (AG-T10 (\varnothing 0,25 mm) für die Messelektroden und AG-T25 (\varnothing 0,64 mm) für Bad- beziehungsweise Referenzelektrode) mit Schmirgelpapier grober und feiner Körnung angeschliffen, mit Ethanol von Fettspuren gereinigt und anschließend in 3 M KCl durch Anlegen einer Spannung von 1 V für 30 min elektrochemisch oxidiert. Für die Herstellung der Agarbrücken wurde eine 3 M KCl-Lösung für Oozyten sowie eine 140 mM NaCl Lösung für HEK-Zellmessungen mit 1,5% Agarose versetzt, erhitzt und in 100 μ l Pipettenspitzen oder 2 mm-Schläuche gefüllt. Nach Aushärten der Agaroselösung wurden diese zugeschnitten und in steriler NaCl- oder KCl-Lösung gelagert. Während die 3 M KCl Lösung aufgrund der gleichen Mobilität von K^+ und Cl^- kaum zum Diffusionspotential (LJP für „Liquid Junction Potential“) beiträgt und Schwankungen des LJP nach extrazellulärem Pufferwechsel reduziert, könnte der permanente Ausstrom von Ionen der hochkonzentrierten Agarbrücke die Ionenkomposition der extrazellulären Lösung verfälschen, weshalb insbesondere in HEK-Zellen Agarbrücken mit physiologischeren 140 mM NaCl verwendet wurden [Halliwell et al., 1994].

Pipetten. Pipetten von geringem elektrischen Widerstand (1,0 M Ω -1,5 M Ω für TEVC-Messungen und 1,8 M Ω -2,8 M Ω für Patch Clamp Messungen) wurden aus Borosilikatkapillaren mit Hilfe der Pipettenpuller P-1000 mit einem 1,0 mm Kastenfilament für Patch-Clamp-Pipetten und P-97 mit einem 1,0 mm Trogfilament für TEVC-Pipetten gezogen. Patchpipetten wurden anschließend mit Hilfe eines Heizdrahtes feuerpoliert und staubfrei aufbewahrt.

Messpuffer. Die benötigten Chemikalien wurden von den Firmen Sigma-Aldrich und Roth mit mindestens 99%-iger Reinheit bezogen, mit einer Feinwaage eingewogen und in ddH₂O gelöst.

Puffer	NaCl [mM]	CholinCl [mM]	NaGluconat [mM]	KCl [mM]	CaCl ₂ [mM]	MgCl ₂ [mM]	Citrat [mM]	MES [mM]	MOPS [mM]	pH _e
100 mM NaCl pH _e 7,5 (standard)	100	-	-	1	0,1	1	-	-	5	7,5
100 mM CholinCl pH _e 7,5	1	100	-	1	0,1	1	-	-	5	7,5
100 mM NaGluconat pH _e 7,5	1	-	100	1	0,1	1	-	-	5	7,5
100 mM KCl pH _e 7,5	1	-	-	100	0,1	1	-	-	5	7,5
100 mM NaCl 1 mM MOPS pH _e 7,5	100	-	-	1	0,1	1	-	-	1	7,5
100 mM NaCl 0,1 mM MOPS pH _e 7,5	100	-	-	1	0,1	1	-	-	0,1	7,5
100 mM NaCl pH _e 8,0	100	-	-	1	0,1	1	-	-	5	8,0
100 mM NaCl pH _e 7,0	100	-	-	1	0,1	1	-	-	5	7,0
100 mM NaCl pH _e 6,5	100	-	-	1	0,1	1	-	5	-	6,5
100 mM NaCl pH _e 6,0	100	-	-	1	0,1	1	-	5	-	6,0
100 mM NaCl pH _e 5,5	100	-	-	1	0,1	1	5	-	-	5,5
100 mM NaCl pH _e 5,0	100	-	-	1	0,1	1	5	-	-	5,0
100 mM NaCl pH _e 4,5	100	-	-	1	0,1	1	5	-	-	4,5
100 mM NaCl pH _e 4,0	100	-	-	1	0,1	1	5	-	-	4,0

Tabelle 3.7: Zusammensetzung der extrazellulären Puffer für TEVC-Messungen in Oozyten. Der Citrat Puffer setzt sich je nach pH-Wert zu unterschiedlichen Verhältnissen aus Na₃Citrat und Zitronensäure zusammen.

Der pH-Wert wurde mit einem pH-Meter bestimmt und je nach experimenteller Anforderung mit 1 M NMDG⁺, 1 M NaOH, 1 M NaOH, 1 M HCl oder 0,1 M Zitronensäure eingestellt. Die Osmolarität der Puffer für „Whole-cell-patch-clamp“-Messungen wurde mit Glukose auf 290 mOSM für die intrazellulären Pipettenlösungen und 310 mOSM für die extrazellulären Pufferlösungen eingestellt und mit einem OM-815-Osmometer kontrolliert. Alle Lösungen wurden mit einer Porengröße von 0,22 µm sterilfiltriert und sind in ihre Zusammensetzung ist in den Tabellen 3.7, 3.8 und 3.9 zusammengefasst.

3.3.2 Experimenteller Aufbau

Für die elektrophysiologischen Experimente dieser Arbeit wurden je nach Expressionssystem (*Xenopus laevis* Oozyten oder HEK293-Zellen) sowie dem experimentellen Vorgehen (entweder ausschließlich elektrische Messungen oder elektrische Messungen in Kombination mit fluoreszenzgebenden Verfahren) drei verschiedene Messplätze verwendet.

Die zu messenden Zellen wurden in einer maßangefertigten Messkammer unter einem Mikroskop auf einem schwingungsgedämpften Tisch platziert und von äußeren Störsignalen durch einen Faradayschen Käfig abgeschirmt. Die Messelektroden wurden durch mechanische oder piezoelektrische Mikromanipulatoren genau platziert. Eine Wassersäule unterstützte die Regulation des Über- und Unterdrucks in der Patchpipette während der Annäherung an die Zelle bzw. der Ausbildung des sogenannten „Gigaseals“ mit der Zellmembran. Automatische oder manuell aktivierte Peris-

Puffer	NaCl [mM]	NMDGCl [mM]	GuanidiniumCl [mM]	NaGluconat [mM]	KCl [mM]	CsCl [mM]	CaCl ₂ [mM]	MgCl ₂ [mM]	Citrat [mM]	MES [mM]	HEPES [mM]	TRIS [mM]	pH _e
110 mM NaCl pH _e 7,2 (standard)	110	-	-	-	1	1	2	2	-	-	10	-	7,2
110 mM NMDGCl pH _e 7,2	1	110	-	-	1	1	2	2	-	-	10	-	7,2
110 mM GuanidiniumCl pH _e 7,2	1	-	110	-	1	1	2	2	-	-	10	-	7,2
110 mM KCl pH _e 7,2	1	-	-	-	110	1	2	2	-	-	10	-	7,2
55 mM CaCl ₂ pH _e 7,2	1	-	-	-	1	1	55	2	-	-	10	-	7,2
70 mM CaCl ₂ pH _e 7,2	1	-	-	-	1	1	70	2	-	-	10	-	7,2
55 mM MgCl ₂ pH _e 7,2	1	-	-	-	1	1	2	55	-	-	10	-	7,2
110 mM NaCl pH _e 9,0	110	-	-	-	1	1	2	2	-	-	-	10	9,0
110 mM NMDGCl pH _e 9,0	1	110	-	-	1	1	2	2	-	-	-	10	9,0
110 mM GuanidiniumCl pH _e 9,0	1	-	110	-	1	1	2	2	-	-	-	10	9,0
110 mM KCl pH _e 9,0	1	-	-	-	110	1	2	2	-	-	-	10	9,0
55 mM CaCl ₂ pH _e 9,0	1	-	-	-	1	1	55	2	-	-	-	10	9,0
55 mM MgCl ₂ pH _e 9,0	1	-	-	-	1	1	2	55	-	-	-	10	9,0
110 mM NaCl pH _e 8,4	110	-	-	-	1	1	2	2	-	-	-	10	8,4
110 mM NaCl pH _e 7,8	110	-	-	-	1	1	2	2	-	-	10	-	7,8
110 mM NaCl pH _e 6,6	110	-	-	-	1	1	2	2	-	-	10	-	6,6
110 mM NaCl pH _e 6,0	110	-	-	-	1	1	2	2	-	10	-	-	6,0
110 mM NaCl pH _e 5,0	110	-	-	-	1	1	2	2	10	-	-	-	5,0
140 mM NaCl pH _e 7,2	140	-	-	-	1	1	2	2	-	-	10	-	7,2
140 mM NaGluconat pH _e 7,2	1	-	-	140	1	1	2	2	-	-	10	-	7,2

Tabelle 3.8: Zusammensetzung der extrazellulären Messpuffer für „Whole-cell-patch-clamp“-Messungen an HEK293-Zellen. Für alle Messpuffer wurde der pH-Wert mit Hilfe von NMDG⁺ und HCl und die Osmolarität mit Glukose auf 310 mOSM eingestellt. Der Citrat-Puffer setzt sich je nach pH-Wert zu unterschiedlichen Verhältnissen aus Na₃Citrat und Zitronensäure zusammen.

taltikpumpen regulierten das extrazelluläre Pufferniveau. Die Aktivierung der untersuchten Photorezeptoren erfolgte durch Licht, welches für die „Whole-cell-patch-clamp“-Messungen im den Epifluoreszenzport des Mikroskops eingespeist und für die TEVC-Messungen über einen Lichtleiter und eine Glasscheibe auf der Unterseite der Messkammer direkt auf die Oozyte gelenkt wurde. Es wurden drei qualitativ unterschiedliche Lichtquellen verwendet, welche an einzelnen Messplätzen gleichzeitig oder durch einen motorisiert schwenkbaren Spiegel im schnellen Wechsel verwendet werden konnten. Elektronisch gesteuerte Shutter-Systeme ermöglichten eine genaue Abstimmung der Belichtungszeiten.

Puffer	NaCl [mM]	NMDGCl [mM]	NaGluconat [mM]	KCl [mM]	CsCl [mM]	CaCl ₂ [mM]	MgCl ₂ [mM]	EGTA [mM]	Citrat [mM]	HEPES [mM]	TRIS [mM]	pH _i
110 mM NaCl pH _i 7,2 (standard)	110	-	-	1	1	2	2	10	-	10	-	7,2
110 mM NaCl 100 mM HEPES pH _i 7,2	55	-	-	1	1	2	2	10	-	100	-	7,2
110 mM NaGluconat pH _i 7,2	1	-	110	1	1	2	2	10	-	10	-	7,2
110 mM NaCl pH _i 5,0	110	-	-	1	1	2	2	10	-	10	-	5,0
110 mM NaCl pH _i 8,0	110	-	-	1	1	2	2	10	-	-	10	8,0
110 mM NaCl pH _i 9,0	110	-	-	1	1	2	2	10	-	-	10	9,0
110 mM NMDGCl pH _i 9,0	1	110	-	1	1	2	2	10	-	-	10	9,0

Tabelle 3.9: Zusammensetzung der intrazellulären Pipettenlösungen für „Whole-cell-patch-clamp“-Messungen an HEK293-Zellen. Für alle Pipettenlösungen wurde der pH-Wert mit Hilfe von NMDG⁺ und HCl/Zitronensäure und die Osmolarität mit Glukose auf 290 mOsm eingestellt. Der Citrat Puffer setzt sich je nach pH-Wert zu unterschiedlichen Verhältnissen aus Na₃Citrat und Zitronensäure zusammen.

Der Polychrom V erlaubte mit Hilfe eines galvanometrisch bewegbaren Beugungsgitters und eines fixierten Spaltes variabler Breite die schnelle Selektion von Licht bestimmter Wellenlänge aus dem kontinuierlichen Spektrum einer Xenon-Gasentladungslampe. Ein im Strahlengang positioniertes, motorisiertes und programmierbares Graufilterrad mit Bereichen unterschiedlicher optischer Dichte ermöglichte eine genaue Anpassung der Photonendichte für die jeweils selektierten Wellenlängen.

Eine Xenon-Gasentladungslampe konnte an den „Patch Clamp“-Messplätzen als weitere Lichtquelle durch einen Strahlenteiler in den Strahlengang eingespeist werden und diente für die Messungen an *Xenopus laevis* Oozyten als einzige Lichtquelle. Die Auswahl von Licht bestimmter Wellenlänge erfolgte hier durch optische Bandpassfilter.

Ein nanosekundengepulstes, wellenlängenverstellbares Lasersystem wurde im Rahmen dieser Arbeit zusammen mit Dr. Jonas Wietek als dritte Lichtquelle zur ultrakurzen Anregung etabliert. Das gepulste 355 nm-Laserlicht eines Nd:YAG-Pumplasers kann in der als kompaktes System erworbenen Opolette unter Verwendung eines optisch parametrischen Oszillators (OPO) und einem anschließenden variablen Intensitätsdämpfer zur Erzeugung kurzer Laserpulse verschiedener Farbe und Intensität genutzt werden. Das Einspeisen der Laserpulse in den Epifluoreszenzeingang des Mikroskops erfolgte durch einen motorisierten, beweglichen Spiegel unter zeitweiliger Unterbrechung des Strahlenganges der anderen Lichtquellen.

Eine detaillierte Auflistung aller wichtigen Bestandteile der beschriebenen Messplätze findet sich in Tabelle 3.10. Eine reduzierte sowie vollständige graphische Skizze des Messplatzes „HEK1“ kann als Übersicht bei Grimm et al. [2017] und Wietek [2018] eingesehen werden.

Gerät	HEK 1	HEK 2	Oozyten
Verstärker	AxoPatch 200B	AxoPatch 200B	GeneClamp 500
AD-Umwandler	DigiData 1440A	DigiData 1440A	DigiData 1322A
Lichtquelle 1	Polychrom V mit motorisiertem Neutralfilterrad und VS25/VCM-D1-Shuttersystem	Polychrom V mit VS25/T132-Shuttersystem	75W-Xenonlampe mit K55-Bandpassfilter und LS6ZM2/TTL-2-Shuttersystem
Lichtquelle 2	150W-Xenonlampe mit Bandpass- und Graufiltern und VS25/VCM-D1-Shuttersystem	75W-Xenonlampe mit 560 nm-Bandpassfilter und VS25/VCM-D1-Shuttersystem	keine
Lichtquelle 3	Opolette-HE-355-LD-Laser/OPO-System, AC127-019-A-ML achromatische Linse zur Einkopplung, M37L02 Multimodefaser, LS6ZM2/VCM-D1-Shuttersystem	keine	keine
Weiter optische Elemente	BB1-E02 dichroitischer Spiegel auf einem MFF101/M motorisierten Filterwechsler zum Einkoppeln von Lichtquelle 3, 30%R/70%T Strahlenteiler zum Zusammenführen des Strahlenganges von Lichtquelle 1 und 2, 69008-ET-ECFP/EYFP/mCherry-Triplebandfilterset zur Betrachtung fluoreszierender Zellen, 90%R/10%T Strahlenteiler für die elektrophysiologischen Messungen	70%R/30%T Strahlenteiler zum Zusammenführen des Strahlenganges von Lichtquelle 1 und 2, FF493/574 Dichroitischer Spiegel für FURA-2 und pHluorin-Messungen, dichroitischer 444/520/590-HC-Dreiband-Spiegel und 465/537/623-HC-Dreiband-Emissionsfilter für BCECF-Messungen	keine
Mikroskop	Axiovert 100 Inverses Mikroskop mit Wasser-Plan-Apochromat 40x/1.0-DIC-Objektiv	Olympus iX70 mit Fluor 40x/1.30 Öl-Objektiv	Wild M32 Stereomikroskop
Mikromanipulator	PatchStar	PatchStar	
Kamera	Wat-221S CCD	Imago CCD und AVT-BC	keine
Lösungsaustausch	manuell	manuell	ValveLink8.2-Pinch-Valve-Perfusionssystem
Lösungsregulation	Ringer-Bath-Handler MPCU	PumpPro	PumpPro

Tabelle 3.10: Wichtige Einzelkomponenten der elektrophysiologischen Messapparaturen Der Großteil der elektrophysiologischen Messungen in HEK293-Zellen dieser Arbeit wurde am Messplatz „HEK1“ durchgeführt. Aufbau und technische Komponenten dieses Messplatzes sind im Detail von Grimm et al. [2017] und Wietek [2018] zusammengefasst. Messungen mit FURA-2, pHluorin und BCECF wurden dagegen an „HEK2“ durchgeführt. TEVC-Messungen an *Xenopus laevis* Oozyten an „Oozyten“. Der TEVC-Messplatz wurde ausgenommen in dieser Arbeit eingeführter technischer Ergänzungen von Berndt [2011] beschrieben.

3.3.3 Durchführung der elektrophysiologischen Messungen

Die Messung von Photoströmen in *Xenopus laevis* Oozyten erfolgte 3 - 4 d nach Injektion der RNA. Photoströme in HEK293-Zellen wurden 28 - 60 h nach Transfektion gemessen. Alle elektrischen Experimente wurden mit der Software pClamp (pClamp 11.4 an HEK1, pClamp 10.4 an

HEK2 und pClamp 9.4 für die TEVC-Messungen) am Computer kontrolliert und aufgezeichnet. Die in den unterschiedlichen Experimenten verwendeten Lichtintensitäten sind in Tabelle 3.11 zusammengefasst.

Experiment	Optische Elemente	Anregung	Wellenlänge	Lichtintensität/ Pulsintensität
TEVC (Oozyten)	75W Xenon-Lampe + KK55-Filter	CsR _{T46N}	560 nm	2,96 mW/mm ²
pH _e -Bildgebung (HEK2)	Polychrom V, 30%T-ST, FF493/574-DS	pHluorin	480 nm	0,34 mW/mm ²
	75W Xenonlampe, 70%R-ST, FF493/574-DS + 560 nm-BBF	CsR _{T46N}	560 nm	1,89 mW/mm ²
Ca ²⁺ -Bildgebung (HEK2)	75W Xenonlampe, 70%R-ST, FF493/574-DS + 450/560nm-BBF	CrChR2 _{T159C}	450 nm	2,9 mW/mm ²
		Chrimson	560 nm	0,9 mW/mm ²
	Polychrom V, 30%T-ST, FF493/574-DS	FURA-2	340 nm 380 nm	0,004 mW/mm ² 0,1 mW/mm ²
pH _i -Bildgebung (HEK2)	Polychrom V, 30%T-ST, 444/520/590-DS, 465/537/523-EF	BCECF	500 nm	0,4 mW/mm ²
	75W Xenonlampe, 70%R-ST, 444/520/590-DS, 465/537/523-EF + 560 nm-BBF	ChRs	560 nm	0,8 mW/mm ²
Patch-Clamp Dauerlicht (HEK1)	Polychrom V + 90%R-ST	Chrimson	650 nm	*2,74 mW/mm ²
			600 nm	2,37 mW/mm ² / *3,5 mW/mm ²
			580 nm	2,28 mW/mm ²
			520 nm	2,47 mW/mm ²
		ChRs und CsR	490 nm	*5,7 mW/mm ²
			470 nm	3,4 mW/mm ²
			450 nm	*5,2 mW/mm ²
7 ns-Laseranregung (HEK1)	Opolette HENd:YAG laser, BB1-E02-DS, 90%R-ST	CrChR2/C1C2	470 nm	100 µJ/mm ²
		CsR	520 nm	145 µJ/mm ²
			560 nm	180 µJ/mm ²
		Chrimson	580 nm	126 µJ/mm ²
			600 nm	120 µJ/mm ²
Vorbelichtungs- experimente (HEK1)	150W Xenonlampe, 30%R-ST, 90%R-ST + BBF	Chrimson	695 nm	6,1 mW/mm ²
			408 nm	1,36 mW/mm ²
	Polychrom V, 70%T-ST, 90%R-ST + BBF	Chrimson	600 nm	2,31 mW/mm ²
			560 nm	2,83 mW/mm ²

Tabelle 3.11: Lichtintensitäten der elektrophysiologischen und bildgebenden Experimente gemessen nach dem das Licht alle optischen Elemente des Messplatzes durchlaufen hat und direkt auf der Ebene der untersuchten Zellen. Die Lichtintensität des Polychrom und der Xenonlampe wurde mit dem Optometer P9710 und die Lichtintensität einzelner Laserpulse mit dem thermischen Energiesensors S470C gemessen. * wurden mit einer neuen Lampe gemessen (ST = Strahlenteiler, BBF = Breitbandfilter, EF = Emissionsfilter, DS = dichroitischer Spiegel, R = Reflektion, T = Transmission).

Two-Electrode-Voltage-Clamp-Messungen Nach optischer Inspektion und Platzierung der Oozyte über dem Lichtleiter (Ø 2 mm) in der pufferbefüllten Messkammer wurden im „Current clamp“-Modus die mit 3 M KCl-Lösung gefüllten Glaspipetten der Strom- und Spannungselek-

trode in die Oozyte gestochen. Nach Umschalten in den „Voltage Clamp“-Modus konnte der Membranwiderstand und die Membrankapazität der Oozyte durch Applikation eines kurzen Spannungspulses getestet werden⁶. Die gemessenen Ströme wurden durch den im Verstärker integrierten 0,5 kHz Besselfilter gefiltert und mit einer Sampling-Rate von 1 kHz aufgenommen. Alle Messungen wurden - so weit nicht anders notiert - mit konstanter Perfusion von $1,8 \pm 0,2$ ml/min bei einer Größe der Messkammer von 300 μ l durchgeführt. Für das Messen von Strom-Spannungskurven wurde die angelegte Membranspannung variiert. Für die Lichttitration wurde die Lichtintensität des Aktivierungslichtes durch optische Graufilter angepasst. Für die Messung bei unterschiedlichen pH_e -Werten oder anderen Pufferbedingungen wurde die Pufferzufuhr des gravitäsgetriebenen Perfusionssystems zwischen acht unterschiedlichen Reservoiren umgeschaltet.

Whole-Cell-Patch-Clamp-Messungen Durch das fusionierte fluoreszente Protein konnten HEK293-Zellen ausgewählt werden, die sowohl das zu untersuchende Protein exprimierten als auch keine Zellkontakte zu Nachbarzellen hatten⁷. Mit Hilfe der Wassersäule wurde unter konstantem Überdruck die Patchpipette zur Oberfläche der Zelle gebracht und diese anschließend bei gleichzeitiger Applikation einer negativen Spannung zur Erleichterung der Patchausbildung leicht angesaugt. Nach Bildung eines G Ω -Widerstandes mit der Membranoberfläche (dem sogenannten „Gigaseal“ (engl.)) wurde der Unterdruck in der Patchpipette vorsichtig erhöht, bis der Membranpatch unter Beibehaltung der Pipetten-Membran-Interaktion (dem „Gigaseal“) in die Pipettenlösung angesaugt wurde und sich damit die Whole-Cell-Konfiguration einstellte. Nach langsamem Austausch der löslichen Komponenten des Zytoplasmas mit der Pipettenlösung [Pusch and Neher, 1988], konnte durch Applikation eines 10 mV Testpulses die Größe des Zugangswiderstandes, des Membranwiderstandes und der Zellkapazität bestimmt werden⁸. Für zeitlich hochaufgelöste Lasermessungen wurde anschließend der Serienwiderstand und die „Whole-Cell“-Parameter kompensiert und die Membranspannung der Zelle entsprechend ihres Ruhepotentials geklemmt. Photoströme wurden mit Hilfe des im Verstärker integrierten Besselfilters bei 2 kHz beziehungsweise 100 kHz für Messungen unter Dauerlicht bzw. nach ultrakurzer Laseranregungen gefiltert und anschließend mit 10 kHz und 250 kHz aufgenommen. Die Messung von Aktionspektren erfolgte bei -60 mV oder 30 mV nach 10 ms Belichtung mit verschiedenen Lichtfarben gleicher, den Photostrom nicht sättigender Photonendichten. Die Photonenzahl bei unterschiedlichen Belichtungsfarben wurde durch das motorisierte Neutralfilterrad und ein regelmäßig adjustiertes LabView-Program angepasst. Photostromdichten und Schließkinetik wurden nach 500 ms Anregung der untersuchten Proteine in ihrem Aktionsmaximum bestimmt. Für die Untersuchung der Lichtsensitivität konnten Lichtintensitäten zusätzlich durch unterschiedliche Graufilter angepasst werden. Zur Untersuchung der Ionenselektivität wurde weiterhin zwischen verschiedenen Messungen die Membranspannung in Schritten von 15 mV bzw. 20 mV variiert und zwischen unter-

⁶Außer in begründeten Ausnahmen wurden ausschließlich Oozyten mit einem Membranwiderstand größer als 300 k Ω gemessen.

⁷Verschiedene HEK293-Zellen können über „gap junction“ elektrisch miteinander gekoppelt sein und dadurch elektrophysiologische Messungen erschweren [Thomas and Smart, 2005].

⁸Es wurden ausschließlich Zellen verwendet mit einem Zugangswiderstand $R_a < 10$ M Ω sowie einem Membranwiderstand $R_M > 500$ M Ω .

schiedlichen Spannungsreihen der extrazelluläre Puffer ausgetauscht. Der Pufferwechsel erfolgte hierbei manuell durch Zugabe von mindesten 5 ml neuen Messpuffers (bei einem Messkammervolumen von 0,5 ml) unter kontinuierlicher Anpassung der Messkammerfüllung durch eine automatisierte Peristaltikpumpe. Für Vorbelichtungsexperimente wurde in Kombination mit der ultrakurzen Laseranregung über einen motorisiert beweglichen dichroitischen Spiegel zwischen der Anregung durch den ns-Laser und dem Polychrom gewechselt. Für weitere Vorbelichtungsexperimente mit längeren Belichtungsphasen wurde über einen Strahlenteiler der Strahlengang des Polychrom und der Xenon-Gasentladungslampe kombiniert. Zwischen den einzelnen Photostrommessungen wurde je nach verwendetem Konstrukt und der Dauer der Lichtapplikationen 10 - 300 s gewartet um eine ausreichende Wiederherstellung des ursprünglichen Proteindunkelzustandes sowie der ionalen Ausgangsbedingungen zu gewährleisten.

3.4 Bildgebende Verfahren

Die bei der Absorption eines Photons aufgenommene Energiemenge kann durch die Emission von Licht, der sogenannten Fluoreszenz, wieder abgegeben werden. Das Fluoreszenzverhalten eines Moleküls oder Proteins kann dabei durch die spezifische Bindung von Ionen oder Protonen beeinflusst werden. Mikroskopisch können somit Konzentrationsänderungen potentiell geleiteter Ionen wie Ca^{2+} oder H^+ selektiv verfolgt werden. Weiterhin kann für ein fluoreszentes Fusionsprotein dessen Lokalisation innerhalb der Zelle durch konfokale Mikroskopie bestimmt werden. Die Verwendung eines pH-sensitiven fluoreszenten Proteins erlaubt es schließlich, in Kombination mit einem Membrananker Änderungen der Protonenkonzentration direkt an der Membranoberfläche zu betrachten.

3.4.1 Organische und genetisch kodierte Kalzium- und Protonenindikatoren

In dieser Arbeit wurden als intrazelluläre Kalzium- und pH-Indikatoren die organischen Verbindungen FURA-2 [Grynkiewicz et al., 1985] und BCECF (2',7' -bis- (2-carboxyethyl) -5- (and-6) - carboxyfluorescein) [Rink et al., 1982] verwendet. Die Messung extrazellulärer Änderungen der Protonenkonzentration an der Membranoberfläche erfolgte mit Hilfe des fluoreszenten Proteins super-ecliptic pHluorin [Miesenböck et al., 1998, Sankaranarayanan et al., 2000]. Für die Experimente mit FURA-2 und BCECF konnte dabei wesentlich auf Vorarbeiten aus der Diplomarbeit von Dr. Anton Rösler zurückgegriffen werden [Rösler, 2008].

pH- und Ca^{2+} -abhängige Fluoreszenzänderungen Sowohl für FURA-2 als auch für BCECF führt die Bindung von Ca^{2+} beziehungsweise H^+ zu einer Änderung des Anregungsspektrums. Für FURA-2 verschiebt sich das Anregungsmaximum von 363 nm zu 335 nm bei Ca^{2+} -Bindung während die Emissionswellenlänge bei 505 - 511 nm nahezu unverändert bleibt [Grynkiewicz et al., 1985]. Für BCECF ist bei Erhöhung der H^+ -Konzentration die Fluoreszenz bei 535 nm, nach Anregung mit 490 nm reduziert, bleibt jedoch nach Anregung mit 440 nm nahezu gleich [Rink et al., 1982]. Auch für das fluoreszente Protein pHluorinSE wird die Fluoreszenz bei 508 nm

nach Anregung mit 475 nm bei Erniedrigung des pH-Wertes reduziert [Miesenböck et al., 1998, Sankaranarayanan et al., 2000].

Intrazelluläre Beladung als Acetomethylester FURA-2 und BCECF haben in Lösung anionischen Charakter und sind entsprechend nicht membranpermeabel. Durch die Modifikation der geladenen Carboxylgruppen mit Acetomethylestergruppen, welche intrazellulär durch zelleigene Esterase wieder abgespalten werden, kann jedoch die Ladung neutralisiert und die Membranpermeabilität deutlich erhöht werden [Tsien, 1981]. Eine intrazelluläre Beladung von HEK293-Zellen 48 h nach Transfektion mit den Fluoreszenzindikatoren FURA-2 oder BCECF konnte somit wie folgt erzielt werden: Für FURA-2 wurden die Zellen für 5 min in einer Beladungslösung aus serumfreien DMEM und 2 μM FURA-2-AM bei 37 °C inkubiert. Für BCECF wurde eine Beladungslösung aus DPBS, 250 μM Sulfinpyrazon, 2 μM 0,004% Pluronic F-127 und 2 μM BCECF-AM verwendet⁹. Die Beladung erfolgte hier für 5 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Zellen mit DPBS gewaschen und weitere 5 min zur Abspaltung der Acetylesthermodalität gewartet, bevor mit der Messung begonnen wurde.

Intrazelluläre Beladung über die Patch Pipette In Kombination mit „Whole-Cell-Patch-Clamp“-Experimenten konnte die Beladung der Zelle mit BCECF auch über die Patchpipette erfolgen. Hierfür wurden 100 μM BCECF als freie Säure zur Pipettenlösung dazugegeben und nach Etablierung der „Whole-Cell“-Konfiguration innerhalb von 3 min im Zellinnenraum verteilt.

Genetisch kodierter, membranlokalisierter pH-Sensor Für das pH-sensitive fluoreszente Protein pHluorinSE konnte die zelluläre Lokalisation durch die Verwendung der β -Untereinheit der H^+/Na^+ -ATPase (βHK) aus Ratten als Membrananker kontrolliert werden. Durch eine N-terminale Fusion an den C-terminus der βHK -Untereinheit wird eine extrazelluläre Membranständigkeit des Fluorophors erzielt, welche sich funktional durch Fluoreszenzmessungen bei unterschiedlichen extrazellulären pH-Werten testen lässt.

3.4.2 Bildgebung intrazellulärer und lokaler Ca^{2+} - und H^+ -Konzentrationsänderungen in HEK-Zellen

Die Fluoreszenzmessung intra- und extrazellulärer Ca^{2+} - und H^+ -Konzentrationsänderungen erfolgte am Messplatz HEK 2 (siehe Tabelle 3.10).

Experimenteller Aufbau Für die Fluoreszenzbildgebung am Messplatz HEK 2 wurden zwei unterschiedliche Lichtquellen verwendet. Die Anregung des Fluoreszenzindikators erfolgte durch den Polychrom V und die Aktivierung des mikrobiellen Rhodopsins über eine 75W Xenongasentladungslampe unter Verwendung von Breitbandfarbfiltren der dem Rhodopsin entsprechenden

⁹Die Zugabe von Pluronic F-127 und Sulfinpyrazon erfolgte entsprechend früherer Beladungsprotokolle in *Chlamydomonas reinhardtii* [Braun and Hegemann, 1999a] und HEK293-Zellen [Rösler, 2008], wo Pluronic F-127 als oberflächenaktive Substanz die Löslichkeit der Acetomethylester in den verwendeten physiologischen Lösungen unterstützt [Cohen et al., 1974] und Sulfinpyrazon als Inhibitor organischer Aniontransporter den erneuten Export der aufgenommenen Fluoreszenzindikatoren verhindert [Di Virgilio et al., 1988].

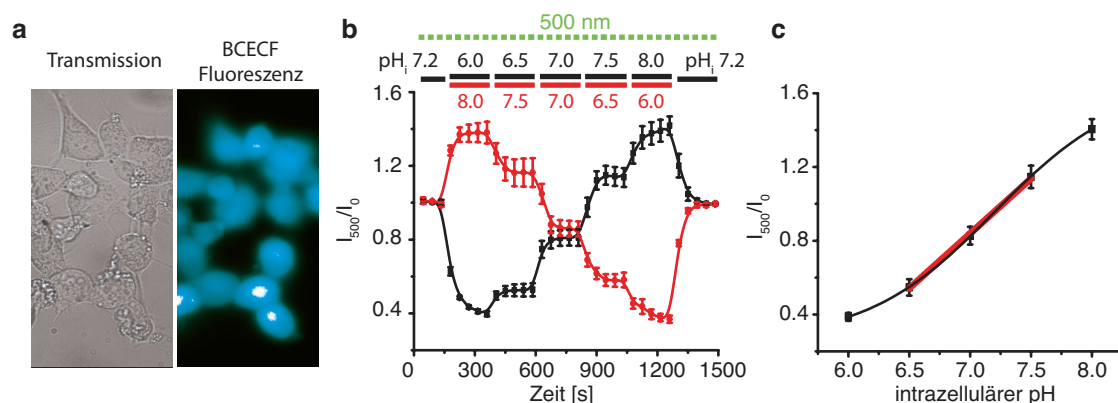


Abbildung 3.1: Intrazelluläre BCECF-Kalibrierung (a) Durchlicht- (links) und Fluoreszenzbild (rechts) BCECF-beladener HEK293-Zellen in 140 mM NaCl und pH_i 7,2. Die Beladung erfolgte durch den Acetomethylester BCECF-AM. Fluoreszenzlicht wurde mit 500 nm angeregt. (b) Mittlere normalisierte Fluoreszenzintensitäten einzelner Zellen bei unterschiedlichen intrazellulären pH_i eingestellt mit Hilfe des K⁺/H⁺-Antiporters Nigericin. (M±SD; schwarz: zunehmende pH_i-Wert mit n=11; rot: abnehmende pH_i-Werte mit n=6) (c) Dosis-Wirkungskurve (schwarz) und lineare Näherung (rot) der gemittelten Fluoreszenzintensitäten aus (b).

Wellenlänge¹⁰. Zur Regulierung der Aktivierungsdauer wurde ein VS25 VCM-D1 Shutter-System verwendet. Die Lichtintensitäten von Polychrom und Xenonlampen wurden durch Neutraldichtefilter einzeln angepasst und sind in Tabelle 3.11 gegeben. Die Strahlengänge beider Lichtquellen wurden vor dem Epifluoreszenzport des Olympus iX70 Mikroskops durch eine 70R/30T-Strahlenteiler zusammengeführt und über einen dichroitischen Zwei- oder Dreibandspiegel¹¹ durch das Fluar 40x/1.30 Öl-Objektiv unter Verwendung eines fluoreszenzfreiem, UV-transparenten Fluka-Immersionöls auf die Zellen gelenkt. Streulicht wurde durch einen zusätzlichen Emissionsfilter reduziert¹². Das fluoreszierte Licht wurde mit einer CCD-Imago-Camera detektiert. Steuerung und Aufzeichnung der Fluoreszenzmessung erfolgte durch die TillVision-Software. Verschiedene extrazelluläre Puffer wurden manuell in die Messkammer gefüllt und durch eine peristaltische Pumpe bei moderater Geschwindigkeit beim Überschreiten einer bestimmten Messkammerfüllung abgepumpt.

Zytoplasmatische pH_i-Bildgebung mittels BCECF-Kalibrierung und Patch-Clamp-Fluorometrie Die intrazelluläre Kalibrierung der BCECF-Fluoreszenz erfolgte nach Beladung der HEK-Zellen mit BCECF-AM. Aufgrund wesentlicher Überlappung der Anregungsspektren von BCECF und dem zur Identifikation transfizierter Zellen benötigten cyanfluoreszierenden Proteins wurde BCECF ausschließlich bei 490 nm angeregt und auf eine ratiometrische Messung mit zusätzlicher Anregung bei 440 nm verzichtet (Abb. 3.1 a). Das Einstellen verschiedener intrazellulärer pH_i-Werte erfolgte über die Angleichung der intra- und extrazellulären Protonenkonzentration durch den K⁺/H⁺-Antiporter Nigericin mit extrazellulären Lösungen fester KCl-Konzentration und unter-

¹⁰450 nm für CrChR2_{T159C} und 560 nm für Chrimson, ReaChR, C1V1 und CsR mit einer Bandbreite von 55 nm und 20 nm.

¹¹FF493/574 für FURA-2 und pHluorinSE Messungen und 444/520/590-HC-triple-band für BCECF.

¹²465/537/623 HC-Triple-Band-Emissionsfilter für BCECF-Messungen

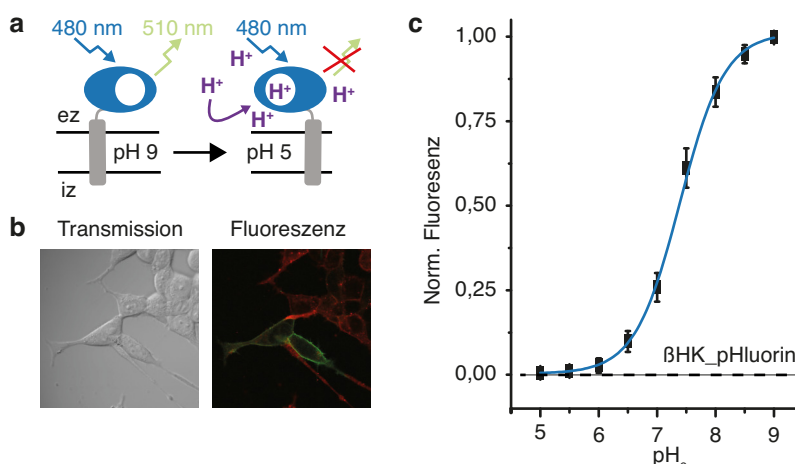


Abbildung 3.2: Kalibrierung des membrangebundenen pHluorinSE (a) Schematische Darstellung der extrazellulären membrangebundenen pH-Bildgebung durch β HK-pHluorinSE mit der β -Untereinheit der H^+/Na^+ -ATPase als Membrananker (grau) und supereklipstischen pHluorinSE (blau). Bei hoher H^+ -Konzentration wird das grüne Fluoreszenzlicht nach 480 nm Anregung reversibel gelöscht. (b) Konfokale Durchlicht- (links) und Fluoreszenzbilder (rechts) von β HK-pHluorinSE in HEK293 mit pHluorinSE nach Anregung mit 480 nm in grün und dem Membranmarker Rhodamin18 nach Anregung mit 559 nm in rot. (c) Normalisierte Fluoreszenz von β HK-pHluorinSE bei verschiedenen extrazellulären pH_e ($M \pm SD$; $n=9$).

schiedlicher pH -Werte [Nehrke, 2006, Thomas et al., 1979]. Kalibrierungslösungen mit 135 mM KCl, 2 mM K_2HPO_4 , 1,2 mM $CaCl_2$, 0,8 mM $MgSO_4$, 20 mM HEPES und 20 μ M Nigericin wurden für die pH_e 6,0, pH_e 6,5, pH_e 7,0, pH_e 7,2, pH_e 7,5 und pH_e 8,0 sowie 320 mOSM (eingestellt mit Glukose) vorbereitet. Anschließend wurde die BCECF-Fluoreszenz bei Anregung mit 500 nm und einer Belichtungszeit von 5 ms alle 45 s gemessen und zeitgleich die extrazellulären Kalibrierungslösungen ausgetauscht (Abb. 3.1 b).

Die Messung intrazellulärer pH -Wert Änderungen zeitgleich zu elektrophysiologischen Messungen erfolgte schließlich nach Beladung der HEK293-Zelle mit BCECF durch die Patch Pipette unter gleichzeitiger Fixierung der Membranspannung durch den Patch-Clamp-Verstärker. BCECF-Fluoreszenzintensitäten und der ChR Photostrom konnten gleichzeitig gemessen werden. BCECF wurde für 5 ms bei 500 nm in einer Frequenz von 2 Hz angeregt und das ChR für 15-20 s mit 560 nm aktiviert. Photoströme wurden elektronisch bei 2 kHz gefiltert und mit 5 kHz aufgenommen. Änderungen der intrazellulären Protonenkonzentration konnten mit Hilfe der intrazellulären BCECF-Kalibrierung berechnet werden (Abb. 3.1 c))

Oberflächennahe pH_e -Bildgebung mittels β HK-pHluorinSE - Kalibrierung und Messung

Die extrazelluläre Kalibrierung des membrangebundenen β HK-pHluorinSE erfolgte 28-48h nach Transfektion mit Hilfe extrazellulärer Puffer unterschiedlicher pH -Werte von pH_e 5,0 bis pH_e 9,0 (Abb. 3.2 a)¹³. β HK-pHluorinSE wurde alle 45 s für 20 ms bei 480 nm angeregt und die Fluoreszenz bei 500-530 nm gemessen. Der extrazelluläre Lösungsaustausch erfolgte per Hand alle 3 min (Abb. 3.2 a).

Für die Quantifizierung lokaler extrazellulärer pH_e -Änderungen durch die Protonenpumpe CsR

¹³Extrazelluläre Kalibrierungspuffer enthielten 140 mM NaCl, 2 mM $MgCl_2$, 2 mM $CaCl_2$, 1 mM KCl und 10 mM Citrat/MES/HEPES/TRIS bei pH_e 5,0-9,0 und 320 mOSM.

wurde pHluorinSE in einer Frequenz von 1 Hz bei 480 nm für 20 ms angeregt. Die Aktivierung von CsR erfolgte für 15 s bei 560 nm. Jede Messung wurde durch einen Pufferwechsel zu pH_e8,0 und pH_e5,0 zur einzelnen Kalibrierung abgeschlossen.

Intrazelluläre Ca²⁺-Bildgebung mittels FURA-2 Zur Vermeidung einer intrazellulären Kalziumakkumulation bereits vor der Messung erfolgte die Suche nach sowohl ChR-exprimierenden als auch FURA-beladenen Zellen bei einer niedrigen Ca²⁺-Konzentration von 2 mM. Anschließend wurde die extrazelluläre Konzentration von CaCl₂ auf 70 mM erhöht. Die Anregung von FURA-2 erfolgte bei 340 nm und 380 nm für 250 ms und 50 ms¹⁴ durch den Polychrom V in einer Frequenz von 0,5 Hz. ChRs wurden für 10 s mit der 75W-Xenongasentladungslampe bei 450 nm und 560 nm angeregt. Auf eine gleichzeitig Rhodopsinanregung und FURA-2-Fluoreszenzmessung wurde aufgrund der Überlappung des 450 nm Anregungslichtes von CrChR2 mit der Fluoreszenzemission des Kalziumindikators verzichtet, was möglich war, da Änderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration auch nach Schließen der ChRs für Sekunden erhalten bleiben [Prigge et al., 2012].

3.4.3 Konfokale Mikroskopie zur Bestimmung der Proteinlokalisierung

Die Bestimmung der Membranexpression und Lokalisation untersuchter mikrobieller Rhodopsine erfolgte mit Hilfe konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Andreas Hermann mit der Unterstützung von Dr. Thomas Korte und Dr. Christiane Grimm. Das aufeinanderfolgende Messen räumlich separierter Fluoreszenzintensitäten durch eine Lochblende erlaubt es hierbei das fusionierte fluoreszente Protein genau zu lokalisieren [Combs, 2010].

Die Zellmembran von HEK293 Zellen 28-56 h nach Transfektion wurde durch kurze Inkubation in 2 μM Octadecyl-Rhodamin-B-Chloride (R-18) markiert. Anschließend wurde das Deckgläschen in der Messkammer eines inversen konfokalen Fluoreszenzmikroskops IX81 als Teil eines FluoView 1000 Mikroskopie Systems platziert und durch ein 60 x 1.2 WaterUplanSApo Objektiv betrachtet. Die Fluoreszenzanregung erfolgte für den Membranmarker R-18 mit einer 559 nm Laserdiode, für den pH-sensitiven Fluorophor pHluorinSE mit einer 488 nm Laserdiode und für das fluoreszente Protein pmCerulean3.0 mit einer 440 nm Laserdiode. Fluoreszenzintensitäten wurden für R18 bei 591 nm, für pHluorinSE bei 510 nm sowie für mCerulean bei 476 nm detektiert.

3.5 Proteinaufreinigung und Absorptionsspektroskopie

Die Proteinaufreinigung von Chrimson aus *Pichia pastoris* erfolgte mittels immobilisierter Metallaffinitätschromatographie basierend auf der Interaktion in einer Matrix immobilisierter Ni²⁺-Ionen und einem C-terminal an Chrimson fusioniertem Polyhistidinmotivs wie durch Bruun et al. [2011] beschrieben wurde und wurde durchgeführt von Thi Bich Thao Nguyen. Das aufgereinigte Protein konnte anschließend in Puffer unterschiedlicher pH-Werte überführt und absorptionsspektroskopisch untersucht werden.

¹⁴Aufgrund der geringen Lichtintensität bei Anregung mit 340 nm wurde die Belichtungszeit verlängert.

Puffer	Zusammensetzung
Aufschlusspuffer	100 mM NaCl; 50 mM TRIS; (1 mM EDTA), 0,1 mM PMSF; 1 Spatelspitze DNaseI; in ddH ₂ O bei pH 8,0
Solubilisierungspuffer	100 mM NaCl; 20 mM TRIS; 1% DDM; 6 µM all- <i>trans</i> Retinal; 0,1 mM PMSF; in ddH ₂ O bei pH 8,0
Laufpuffer	100 mM NaCl; 20 mM TRIS; 20 mM Imidazol; 0,02% DDM; 0,1 mM PMSF; in ddH ₂ O bei pH 7,4
Waschpuffer	100 mM NaCl; 20 mM TRIS; 40 mM Imidazol; 0,02% DDM; 0,1 mM PMSF; in ddH ₂ O bei pH 7,4
Elutionspuffer	100 mM NaCl; 20 mM TRIS; 500 mM Imidazol; 0,02% DDM; 0,1 mM PMSF; in ddH ₂ O bei pH 7,2
Entsalzungspuffer	150 mM NaCl; 20 mM HEPES; 0,02% DDM; in ddH ₂ O bei pH 6,5
Messpuffer	100 mM NaCl; 20 mM Citrat/HEPES/TRIS; 0,02% DDM; in ddH ₂ O bei pH 5,0-9,0

Tabelle 3.12: Zusammensetzung der Puffer für die Proteinaufreinigung Die Aufreinigungspuffer wurden vor der Zugabe von PMSF und DDM autoklaviert und die Messpuffer vor der Zugabe von DDM sterilfiltriert.

Proteinaufreinigung Das geerntete Zellpellet wurde durch Auf- und Abpipettieren in 30 - 50 ml Aufschlusspuffer gelöst und nach dem Potter-Elvehjem-Verfahren homogenisiert. Anschließend wurden die Zellen unter dauerhafter Kühlung in einer French Press in mehreren Zyklen bei 4 - 5 bar aufgeschlossen und Zellwandreste und gröbere Zellbestandteile herunterzentrifugiert (16000 g, 10 min, 4 °C). Aus dem Überstand wurde durch eine weitere Ultrazentrifugation (40000 g, 90 min, 4 °C) die Zellmembran pelletiert, das Membranpellet zu 50 mg/ml in Solubilisierungspuffer homogenisiert und unter konstantem Rühren über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die solubilisierten Membranproteine wurden in einer weiteren Ultrazentrifugation (40000 g, 30 min, 4 °C) von den Membranresten getrennt. Aus dem Überstand konnte mit Hilfe des Äkta-Chromatographiesystems das die Polyhistidinsequenz enthaltene Protein über eine 5 ml HisTrap-HP-Säule oder 5 ml HisTrap-FF-Crude-Säule unter der Verwendung der in Tabelle 3.12 gegebenen Lauf-, Wasch- und Elutionspuffer aufgereinigt werden. Abschließend wurden Imidazolrückstände in einer HiPrep-26/10-Entsalzungssäule mit Sephadex G-25-Matrix entfernt und die Proteinprobe in den Entsalzungspuffer aus Tabelle 3.12 überführt. Es ergab sich eine Ausbeute von 0,9 mg Protein für 1 l *Pichia*-Kultur für den CsChrimson WT.

Absorptionsspektroskopie Das aufgereinigte Protein wurden mit Hilfe von Zentrifugationsfiltern mit einer 56 kDa Porengröße aufkonzentriert bzw. in einen Messpuffer anderen pH-Wertes überführt (40000 g, 5-60 min, 4 °C). Erste absorptionsspektroskopische Messungen zur Konzentrationsbestimmung und pH-Abhängigkeit der aufgereinigten Proteine erfolgten bei 20 °C am Cary-50-Bio-Spektrophotometer. Weiterführende Blitzlichtphotolysemessungen wurden durchgeführt und ausgewertet von Dr. Benjamin Krause wie es in dessen Dissertationsschrift beschrieben ist [Krause, 2018, Krause et al., 2017].

3.6 Datenauswertung und Darstellung

Die Auswertung der elektrischen Strommessungen erfolgte mit Clampfit 10/11 und für die Einzelblitz-Laserexperimente zusätzlich mit Matlab R2017. Bildgebende Experimente zur Änderung der Protonen-

und Kalziumkonzentration wurden ausgewertet mit der TillvisION Software und Bilder des konfokalen Mikroskops mit FluoView FV10-ASW 3.0 sowie dem Fiji-Bildbearbeitungspaket [Schindelin et al., 2012]. Datenbearbeitung und statistische Analyse wurden durchgeführt mit Microsoft Excel und Origin 2017. Strukturdarstellungen wurden erstellt mit Open-Source PyMOL 1.8 sowie CueMol2. Finale Abbildungen wurden schließlich bearbeitet und arrangiert mit Adobe Illustrator CS6. Die verwendeten Computerprogramme sind in Tabelle A.11 im Anhang zusammengefasst.

3.6.1 Elektrophysiologie

Für die elektrophysiologische Untersuchung der Kanalleitfähigkeit, der Farb- und Lichtsensitivität, der Photostromkinetik, sowie der Ionenselektivität wurden aus den unter verschiedener Belichtung, unterschiedlicher Spannung und variierenden Ionenbedingungen gemessenen Photoströmen Aktionsspektren, Photostromdichten, Schließkinetik, Umkehrpotentiale und relative Photostromamplituden bei unterschiedlichen Ionengradienten bestimmt. Die Untersuchung verschiedener Offenzustände in zeitlich hochaufgelösten Einzelblitz-Laserexperimenten wurde durch eine logarithmische Mittlung der Datenpunkte zur weiteren Analyse erleichtert.

Aktionsspektrum Bei Licht verschiedener Wellenlänge gemessene Photoströme wurden - falls notwendig - entsprechend der nachträglich gemessenen Lichtintensitäten nachkorrigiert und auf den maximalen Photostrom normalisiert. Zur Bestimmung der Wellenlänge maximaler Lichtsensitivität wurden die normalisierten Einzelspektren entsprechend Prigge [2012] und Schneider [2014] über eine fünfparametrische Weibullfunktion zur optimalen Anpassung der asymmetrischen Spektralfunktion gefittet:

$$I(S(\lambda)) = I_0 + I_{max} \cdot \left(\frac{a-1}{a} \right)^{\frac{1-a}{a}} \cdot S(\lambda)^{a-1} \cdot e^{-S(\lambda)^a + \frac{a-1}{a}} \quad (3.1)$$

mit: $S(\lambda) = \frac{\lambda - \lambda_{max}}{b} + \left(\frac{a-1}{a} \right)^{\frac{1}{a}}$

λ_{max} entspricht hierbei der Wellenlänge des maximalen Photostroms.

Photostromdichte Die Zellkapazität C_m ist direkt proportional zur Membranoberfläche und wurde über den kapazitiven Strom nach Anlegen eines 10 mV Spannungspulses im Membrantest der pClamp-Software bestimmt [Platzer and Zorn-Pauly, 2016]. Die Photostromdichte j_{ph} wurde dann mit dem maximalen Photostrom I_{max} bei -60 mV berechnet mit:

$$j_{ph} = \frac{I_{max}}{C_m} \quad (3.2)$$

Lichttitration Photostromamplituden nach 500 ms Belichtung unterschiedlicher Lichtintensität konnten auf den maximalen Photostrom normalisiert und gegen die Lichtintensität oder applizierte Photonendichte aufgetragen werden.

Apparente Schließkinetik Der Photostromrückgang nach Belichtung erfolgt in vielen ChRs mit mehr als einer Zeitkonstante [Schneider et al., 2015], kann jedoch zur Vereinfachung in einer apparenten Zeitkonstante τ_{app} zusammengefasst werden. Diese ergibt sich mit den Amplituden A_i und den Zeitkonstanten τ_i der mehr- (meist bi-) exponentiellen Näherung als:

$$\tau_{app} = \frac{\sum_i \tau_i \cdot A_i}{\sum_i A_i} \quad (3.3)$$

Umkehrpotentiale Das Umkehrpotential E_{rev} beschreibt jene Spannung, bei welcher aufgrund des vorliegenden elektrochemischen Gradienten kein Photostrom zu beobachten ist, und wird für eine einzeln geleitete Ionensorte durch die Nernst-Gleichung mit der Allgemeinen Gaskonstante R , der absoluten Temperatur T , der Faraday-Konstante F , der Valenz des geleiteten Ions z sowie dessen extra- und intrazellulärer Konzentration c_e und c_i beschrieben als [Hille, 2001]:

$$E_{rev} = \frac{R \cdot T}{z \cdot F} \cdot \ln \frac{c_e}{c_i} \quad (3.4)$$

Das Umkehrpotential kann in den Stromspannungskurven durch lineare Interpolation der angrenzenden Messwerte bestimmt werden und wurde entsprechend der verwendeten Lösungen durch das Diffusionspotentialen aus Tabelle 3.13 nachträglich korrigiert.

Relative Permeabilitäten Die Annahme einer einzelnen geleiteten Ionensorte ist für ChRs in der Regel nicht gegeben und verschiedene Ionen werden mit unterschiedlicher Permeabilität durch das selbe Photozyklusintermediat geleitet. In diesem Fall kann das Umkehrpotential durch die Goldman-Hodgkin-Katz-Spannungsgleichung beschrieben werden [Hille, 2001]. In der Annahme, dass lediglich Protonen und monovalente Kationen geleitet werden¹⁵, ist das Umkehrpotential E_{rev} mit den Permeabilitäten P_{Na} , P_K und P_H für H^+ , Na^+ und K^+ und deren intra- und extrazellulären Konzentrationen $[Na]_{i/e}$, $[K]_{i/e}$ und $[H]_{i/e}$ gegeben durch:

$$E_{rev} = \frac{R \cdot T}{F} \cdot \ln \frac{P_H \cdot [H]_e + P_{Na} \cdot [Na]_e + P_K \cdot [K]_e}{P_H \cdot [H]_i + P_{Na} \cdot [Na]_i + P_K \cdot [K]_i} \quad (3.5)$$

¹⁵Für die Berechnung der relativen Permeabilitäten von Protonen und monovalenter Ionen wurden divalente Kationen aus folgenden Gründen nicht berücksichtigt: 1. geringe Konzentration von 2 mM und dem entsprechend geringer Beitrag von Ca^{2+} und Mg^{2+} zum Gesamtphotostrom. 2. Für Chrimson kaum Unterschiede der Umkehrpotentialverschiebung beim Austausch von Na^+ mit Ca^{2+} oder dem nicht geleiteten NMDG⁺. 3. Für Chrimson keine Ca^{2+} -Akkumulation in FURA-2 Experimenten trotz langer Belichtung. 4. Publierte Ca^{2+} -Permeabilitäten verschiedener ChRs [Kleinlogel et al., 2011a, Mager et al., 2018] sind deutlich kleiner als die berechneten Permeabilitäten für Na^+ .

Extrazellulärer Puffer	Intrazellulärer Puffer			
	110 mM NaCl pH _i 7,2 (standard)	110 mM NaCl pH _i 9,0	110 mM NMDGCl pH _i 9,0	110 mM NaGluc pH _i 7,2
110 mM NaCl pH _e 7,2 (standard)	0,2 mV	1 mV	-2,2 mV	-
110 mM NMDGCl pH _e 7,2	4,6 mV	4,2 mV	2,1 mV	-
110 mM GdmCl pH _e 7,2	0,3 mV	1,2 mV	-	-
110 mM KCl pH _e 7,2	-3,4 mV	-	-	-
55 mM CaCl ₂ pH _e 7,2	3,4 mV	-	-	-
55 mM MgCl ₂ pH _e 7,2	4,0 mV	-	-	-
140 mM NaGluc pH _e 7,2	-	-	-	-1,2 mV
140 mM NaCl pH _e 7,2	1,4 mV	-	-	11,3 mV
110 mM NaCl pH _e 9,0	-0,2 mV	0,7 mV	-2,4 mV	-
110 mM NMDGCl pH _e 9,0	3,5 mV	4,2 mV	1,0 mV	-
110 mM GdmCl pH _e 9,0	-0,5 mV	0,4 mV	-	-
110 mM KCl pH _e 9,0	-	-2,9 mV	-6,1 mV	-
55 mM CaCl ₂ pH _e 9,0	-	3,8 mV	0,6 mV	-
55 mM MgCl ₂ pH _e 9,0	-	4,4 mV	1,2 mV	-
110 mM NaCl pH _e 8,4	-	-	-2,4 mV	-
110 mM NMDGCl pH _e 8,4	-	-	1,2 mV	-
110 mM NaCl pH _e 7,8	-	-	-2,4 mV	-
110 mM NMDGCl pH _e 7,8	-	-	1,5 mV	-
110 mM NaCl pH _e 6,6	-	-	-2,4 mV	-
110 mM NMDGCl pH _e 6,6	-	-	1,6 mV	-
110 mM NaCl pH _e 6,0	-	-	-2,2 mV	-
110 mM NMDGCl pH _e 6,0	-	-	2,2 mV	-
110 mM NaCl pH _e 5,0	-0,3 mV	-	-	-

Tabelle 3.13: Berücksichtigte Diffusionspotentiale Aufgrund der unterschiedlichen Ionenzusammensetzung der Bad- und Pipettenlösung ergibt sich vor der Patchformation ein Diffusionspotential (das sogenannte „Liquid Junction“-Potential (LJP)) welches für anschließende Messungen in der „Whole-Cell“-Konfiguration sowie beim Austausch der extrazellulären Lösung berücksichtigt werden muss [Neher, 1992]. Für alle verwendeten intra- und extrazelluläre Messpuffer wurde entsprechend das LJP mit Hilfe des in Clampex 10.7 integrierten LJP-Rechners ermittelt und gemäß der Pufferbeschreibung aus Tabelle 3.6 und Tabelle 3.12 hier zusammengetragen.

Mit der Vereinfachung gleicher Permeabilitäten von K⁺ und Na⁺ ($P_{Na} = P_K$)¹⁶ ergibt sich für die Umkehrpotentialverschiebung nach Wechsel des extrazellulären Lösung von Puffer¹ zu Puffer²:

$$\Delta E_{rev} = E_{rev}^2 - E_{rev}^1 = \frac{R \cdot T}{F} \cdot \ln \frac{P_H \cdot [H]_e^2 + P_{Na} \cdot ([Na]_e^2 + [K]_e^2)}{P_H \cdot [H]_e^1 + P_{Na} \cdot ([Na]_e^1 + [K]_e^1)} \quad (3.6)$$

$$\Rightarrow \frac{P_H}{P_{Na}} = \frac{([Na]_e^2 + [K]_e^2) - ([Na]_e^1 + [K]_e^1) \cdot e^{\frac{F \cdot \Delta E_{rev}}{RT}}}{[H]_e^1 \cdot e^{\frac{F \cdot \Delta E_{rev}}{RT}} - [H]_e^2}$$

¹⁶Die Annahme ähnlicher Permeabilität für K⁺ und Na⁺ ist begründet durch die geringe Umkehrpotentialverschiebung beim Austausch des extrazellulären Ions (vor allem in Chrimson) sowie durch frühere Studien [Gaiko and Dempki, 2013, Nagel et al., 2003].

Die relativen Permeabilitäten für H^+ und Na^+ wurden sowohl für die Umkehrpotentialverschiebung nach einer Reduktion der extrazellulären Na^+ als auch nach einer Erhöhung des extrazellulären pH-Wertes berechnet, anschließend gemittelt und die Differenz der Messwerte als Fehler angegeben.

Relative Photostromamplituden Nach Austausch der extrazellulären Lösung bewirken Unterschiede des Diffusionspotentials nicht nur Verschiebungen des Umkehrpotentials, sondern modulieren auch die anliegende Membranspannung bei unterschiedliche Spannungen. Zur besseren Vergleichbarkeit einzelner Messwerte wurden somit auch die normalisierten Photostromamplituden bei -60 mV je nach Ionenbedingung entsprechend des LJP korrigiert. Hierfür wurden an -60 mV angrenzende Messpunkte der Stromspannungskurve auf eine LJP-korrigierte Membranspannung von -60 mV linear extra- oder intrapoliert.

Einzelblitz-Lasereperimente Die gemessenen Photoströme wurden manuell in ClampFit auf das Einsetzen des Q-Switch-Signal-Pulses als Zeitpunkt des Laserblitzes zeitlich ausgerichtet und grundlinienkorrigiert. Mit Hilfe einer zusammen mit Dr. Christiane Grimm und Dr. Jonas Wietek [Wietek, 2018] erarbeiteten Auswerteroutine im Computerprogramm Matlab wurden die gemessenen Stromspuren logarithmisch auf 50 Messpunkte pro zeitlicher Dekade gemittelt und auf den maximalen Pump- oder Kanalstrom ($50 \mu s$ - 5 ms nach dem Laserblitz) normalisiert. Zur Reduktion des statistischen Rauschens wurden einzelne Messungen ein- bis zehnmal für die gleiche Zelle wiederholt, logarithmisch reduziert, normalisiert und gemittelt. Die gemittelte Stromspur wurde als Ergebnis einer einzelnen Zelle verwendet. Die präsentierten Stromspuren, Kinetiken und Amplituden stellen hingegen Mittelwerte verschiedener Zellen dar.

3.6.2 Konfokale Mikroskopie

Die Auswertung konfokaler Bilder mCerulean-fusionierter mikrobieller Rhodopsine erfolgte mit Hilfe des Fiji Image Prozessierungspakets [Schindelin et al., 2012]. Zur Bestimmung der Membranexpression wurde die Membranregion mit Hilfe der R18-Fluoreszenz manuell markiert und die mCerulean Fluoreszenzintensität in der Membranregion quantifiziert. Zur Bestimmung der Membranlokalisation wurde die Membranfluoreszenz zusätzlich mit der Fluoreszenz innerhalb der Zelle verglichen und der Quotient aus der 476 nm-Fluoreszenz in der Plasmamembran und im Zytoplasma gebildet. Die Darstellung konfokaler Fluoreszenzbilder erfolgte mit Hilfe der Fluoview FV10-ASW 3.0 Software.

3.6.3 Bildgebende Verfahren

Die Auswertung der zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen erfolgte mit Hilfe der TillVision Software. Die den Fluoreszenzindikator exprimierenden oder mit ihm beladenen HEK293-Zellen wurden manuell einzeln markiert und die Fluoreszenzintensität der gesamten Zelle ausgelesen und bezüglich der Hintergrundfluoreszenz korrigiert. In Microsoft Excel wurden anschließend die Fluoreszenzwerte einzelner Zellen normalisiert und gemittelt.

Für die Bestimmung der intrazellulären pH-Änderungen wurde als Referenzwert die bekannte

BCECF-Fluoreszenz zum Beginn der Messung mit pH_i 7,2 entsprechend der gepufferten Pipettenlösung verwendet. Für die Bestimmung extrazellulärer pH-Änderungen mit pHluorinSE wurde auf die maximale Fluoreszenzintensität bei pH_e 8,0 normalisiert. Gleichzeitig wurde alle Zellen, die trotz Fluoreszenzlöschung nach dem abschließenden Pufferwechsel zu pH_e 5,0, weiterhin mehr als 20% der maximalen pHluorin Fluoreszenz aufwiesen, aufgrund vermuteter intrazellulärer Akkumulation des pH-Sensors von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Für die ratiometrischen Ca^{2+} -Messungen mit FURA-2 wurde schließlich das Verhältnis der mittleren Fluoreszenzdichten bei 340 nm und 380 nm gebildet und ein Fluoreszenzverhältnis unabhängig von der FURA-2-Beladung der Zelle erhalten.

3.6.4 Statistik

Um eine ausreichende statistische Signifikanz zu garantieren, wurden alle dargestellten Messungen an unterschiedlichen biologischen Replikaten an wenigstens zwei unabhängigen Messtagen mehrfach wiederholt. Die genaue Anzahl der biologischen Probenzahl findet sich in den Tabellen A.1 bis A.6 oder der jeweiligen Abbildungslegende. Zum statistischen Vergleich verschiedener Ergebnisse wurden ein- und zweiseitige t-Tests gegebenenfalls mit Welsch-Korrektur in Origin 2017 durchgeführt. Die Signifikanzniveaus wurden auf $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***), $p < 0.0001$ (****) gesetzt.

4 ERGEBNISSE

4.1 Protonenleitung in Kanalrhodopsinen

4.1.1 Diversität der Protonenselektivität von ChRs

Für einen direkten Vergleich der Protonenselektivität verschiedener ChRs wurden diese in HEK293-Zellen exprimiert und Photoströme nach Anregung im jeweiligen Absorptionsmaximum bei unterschiedlichen Spannungen gemessen (Abb. 4.1 a). Whole-Cell-Patch-Clamp-Messungen erlauben hierbei die beidseitige Kontrolle der intra- und extrazellulären Ionenbedingung. Ausgehend von einer symmetrischen Natrium- und Protonenkonzentration wurde entweder die extrazelluläre Natrium- oder Protonenkonzentration reduziert. Dafür wurde entweder Na^+ durch das nicht geleitete NMDG^+ ausgetauscht oder der extrazelluläre pH_e -Wert von 7,2 auf 9,0 erhöht. Trotz hoher Sequenzhomologie entlang der ionenleitenden Pore unterschieden sich die Photoströme der verschiedenen ChRs erheblich (Abb. 4.1 b). Entsprechend der bereits von Govorunova et al. [2013] gezeigten hohen Na^+ -Leitfähigkeit von *PsChR* verschwinden die Einwärtsströme von *PsChR* bei einer Reduktion der extrazellulären Na^+ -Konzentration fast vollständig, wohingegen bei einer Erniedrigung der extrazellulären H^+ -Konzentration insbesondere der transiente Strom kaum abnimmt (Abb. 4.1 b bis d). Genau der entgegengesetzte Fall ist für Chrimson und *CsChR* zu beobachten. Für beide ChRs hat die Reduktion der extrazellulären Na^+ Konzentration nahezu keinen Einfluss auf den Einwärtsstrom. Eine Reduktion der extrazellulären Protonenkonzentration führt hingegen zu einem (fast) vollständigen Verschwinden desselben. *CrChR2* sowie die Kanalrhodopsinchimären *C1C2*, *C1V1* und *ReaChR* leiten dagegen sowohl Na^+ als auch H^+ und die Reduktion der Konzentration beider Ladungsträger führt zu einer Abnahme des Photostroms.

Zur Quantifizierung der unterschiedlichen Protonenleitfähigkeit wurden die Photoströme auf den maximalen Einwärtsstrom unter symmetrischen Ionenbedingungen (-60 mV) normiert und gegen die angelegte Spannung aufgetragen (Abb. 4.1 c). Aus den Strom-Spannungskurven kann das Umkehrpotential berechnet werden - d.h. jene Spannung bei der sich der chemische Gradient und die angelegte Spannung entsprechend der Leitfähigkeit des Kanals die Waage halten und kein Nettophotostrom mehr fließt (Abb. 4.1 d). Sowohl für Chrimson als auch für *CsChR* ist die Umkehrpotentialverschiebung nach Reduktion der extrazellulären Na^+ -Konzentration klein und Na^+ scheint kaum geleitet zu werden. Gleichzeitig verschiebt sich das Umkehrpotential nach einer Reduktion der extrazellulären H^+ -Konzentration für beide ChRs deutlich und bestätigt eine hohe Protonenselektivität. Während jedoch für Chrimson auch bei pH_e 9,0 noch kleine Einwärtsströme beobachtet wurden, konnten für *CsChR* ausschließlich Auswärtsströme gemessen werden (Abb. 4.1 e). Obwohl im Gegensatz zu anderen ChRs sowohl Chrimson als auch *CsChR* fast ausschließlich Protonen leiten, besitzt Chrimson eine Restkationleitfähigkeit, wohingegen *CsChR*

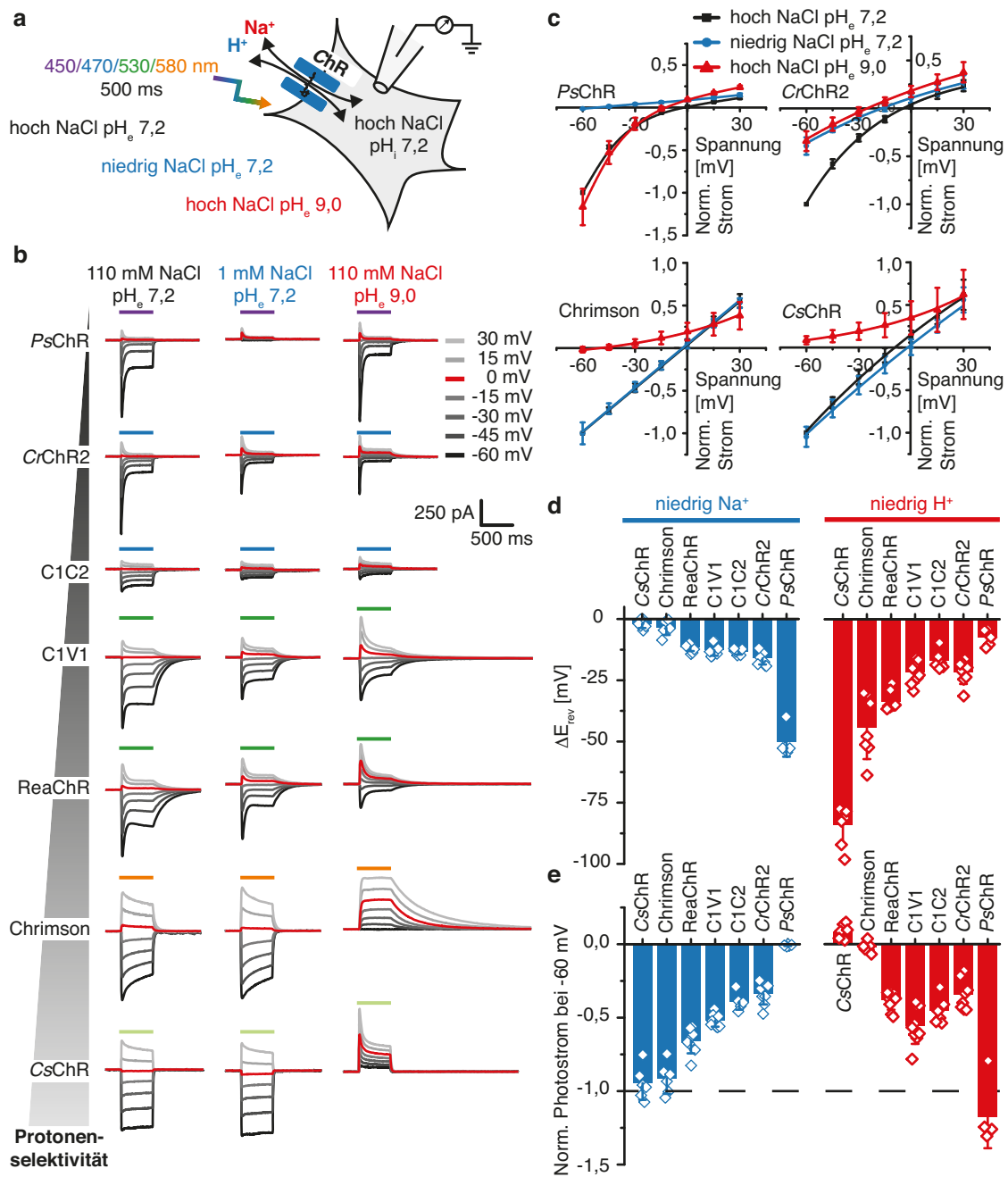


Abbildung 4.1: Protonenselektivität verschiedener ChRs (a) Experimenteller Aufbau: ChRs heterolog exprimiert in HEK293-Zellen werden in der Farbe ihrer maximalen Aktivität für 500 ms belichtet und Photoströme bei verschiedenen Spannungen sowie hoher oder niedriger extrazellulärer Na⁺- und H⁺-Konzentration gemessen (hoch: pH 7,2 und 110 mM NaCl ; niedrig: pH 9,0 und 1 mM NaCl). (b) Repräsentative Photostromspuren verschiedener ChRs, gemessen wie in (a). (c) Stromspannungskurven verschiedener ChRs gemessen wie in (a+b) (PsChR n=5; CrChR2 n=8-12; Chrimson n=6-15; CsChR n=6-17). (d) Umkehrpotentialverschiebung nach Reduktion der extrazellulären Na⁺-Konzentration (links) oder H⁺-Konzentration (rechts) (Umkehrpotentiale von CsChR bei pH_e 9,0 wurden durch eine lineare Extrapolation der IV-Kurven abgeschätzt.). (e) Normalisierte Photostromamplituden verschiedener ChRs bei -60 mV nach Reduktion der extrazellulären Na⁺-Konzentration (links) oder H⁺-Konzentration (rechts). Die gestrichelte Linie markiert den Photostrom bei hoher symmetrischer Na⁺- und H⁺-Konzentration. Alle Daten zeigen M ± SD.

vermutlich ein reiner Protonenkanal ist.

Aus den Umkehrpotentialverschiebungen kann schließlich mit Hilfe der Goldman-Hodgkin-Katz-Spannungsgleichung die relative Protonenpermeabilität P_{H^+}/P_{Na^+} berechnet werden (siehe auch Tab. A.1). Die P_{H^+}/P_{Na^+} für CsChR und Chrimson war $\geq 0,5 \times 10^8$ und $1,0 \pm 0,1 \times 10^7$ und somit deutlich höher als jene von CrChR2 und PsChR mit $2,2 \pm 0,3 \times 10^6$ und $4,3 \pm 1,8 \times 10^5$. Gleichzeitig bestätigt die ermittelte Protonenpermeabilität von CrChR2 früher publizierte Werte von $\sim 10^6$ [Nagel et al., 2003] und $2,5 \times 10^6$ [Kleinlogel et al., 2011a].

4.1.2 Protonenleitfähigkeit und Änderung des intrazellulären pH-Wertes

Große Protonenströme der ChRs können bei physiologisch meist niedriger Protonenkonzentration zu einer deutlichen Änderung des intrazellulären pH-Wertes führen - wie bereits von Lin et al. [2009] gezeigt werden konnte. Mit Hilfe des blaugrün fluoreszierenden pH-Indikators BCECF können intrazelluläre pH-Wert-Änderungen und Photoströme rotlichtaktivierter ChRs gleichzeitig gemessen werden. Der wasserlösliche Fluoreszenzindikator BCECF wurde hierfür der Pipettenlösung zugesetzt und verteilte sich nach Etablierung der Whole-Cell-Patch-Clamp-Konfiguration zusammen mit der Pipettenlösung im Zytoplasma der abgeleiteten Zelle (Abb. 4.2 a). Nach Anregung mit kurzen 500 nm-Lichtpulsen niedriger Intensität konnten anschließend intrazelluläre pH-Wert-Änderungen direkt als Fluoreszenzintensitätsänderung des bei 530 nm emittierten Lichtes beobachtet werden.

Für eine Chrimson exprimierende Zelle in symmetrischer Na^+ - und H^+ -Konzentration führt die Belichtung mit 560 nm je nach angelegter Membranspannung (-60 mV oder 20 mV) zu großen Ein- oder Auswärtsströmen (Abb. 4.2 b+c oben). Überraschenderweise kommt es hierbei sowohl bei negativen als auch bei positiven Spannungen zu einem zwar langsamen, dafür jedoch ausgeprägten Photostromrückgang. Ein vergleichbarer Photostromrückgang wurde bereits von Klapoetke et al. [2014] beobachtet und als Inaktivierung des Chrimsonkanals interpretiert. Wurde Chrimson in dieser Arbeit nach fast vollständigen Photostromrückgang bei -20 mV jedoch erneut aktiviert, so floss der Photostrom in unterschiedliche Richtung je nachdem, ob der Kanal vorher bei -60 mV oder bei 20 mV aktiviert wurde. Durch eine Inaktivierung des Chrimsonproteins allein nicht zu erklären, kann dieses Phänomen durch die gleichzeitig zum Photostromrückgang gemessenen BCECF-Fluoreszenzänderungen verstanden werden. Der BCECF Fluorophor zeigte hierbei eine deutliche Fluoreszenzabnahme zeitgleich zum Chrimsonphotostrom bei -60 mV sowie eine ausgeprägte Fluoreszenzzunahme während des Chrimsonphotostroms bei 20 mV (Abb. 4.2 b bis d). Je nach Spannung kommt es entsprechend zu einer Abnahme bzw. Zunahme des intrazellulären pH-Wertes. Die Änderung des intrazellulären pH-Wertes wird durch den Chrimsonphotostrom selbst verursacht und tritt nicht in Zellen auf, die ausschließlich das fluoreszierende Protein eCFP exprimieren (Abb. 4.2 d). Gleichzeitig ist bei größerer Photostromamplitude von Chrimson sowohl die Geschwindigkeit als auch der Grad der intrazellulären pH-Wert-Änderung - gemessen als τ_{BCECF} und $\Delta F_{500nm}/F_0$ - schneller und ausgeprägter (Abb. 4.2 e und f). Hierbei entsprach trotz hoher Variabilität der BCECF-Fluoreszenzänderung in jeder einzelnen Zelle die Kinetik der pH-Wert-Änderung nahezu deckungsgleich der Kinetik der Photostromabnahme (Abb. 4.2 g). Insgesamt

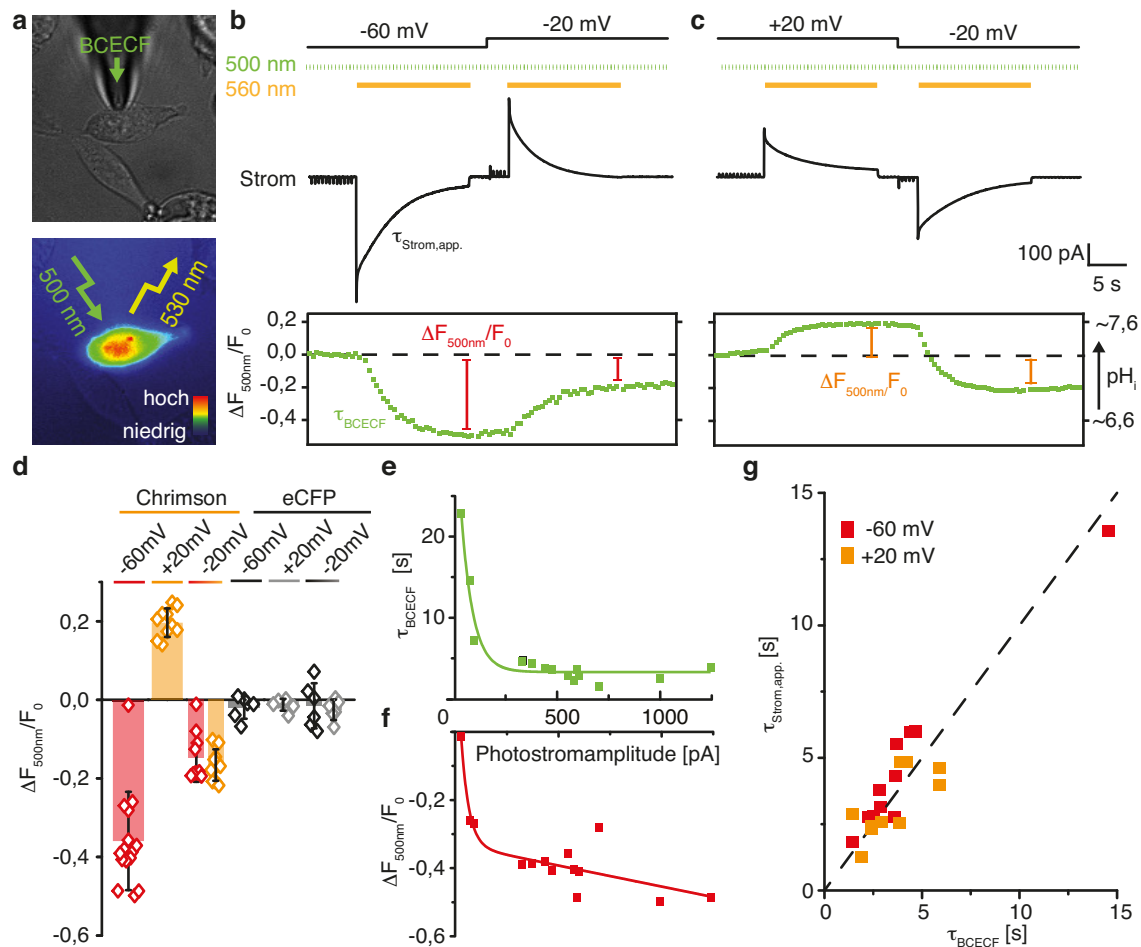


Abbildung 4.2: Intrazelluläre pH-Wert-Änderungen und Photostromrückgang in Chrimson (a) Oben: Beladung einer HEK293 Zelle mit $100\ \mu\text{M}$ BCECF über die Pipettenlösung in Whole-Cell-Patch-Clamp-Messungen. Unten: BCECF-Fluoreszenz beladener Zelle nach Anregung mit 500 nm Pulsen (5 ms, 2 Hz). (b) Repräsentative Photoströme (Mitte) und relative BCECF-Fluoreszenzänderungen (unten) einer Chrimson exprimierenden Zelle bei wiederholter 15 s Anregung mit 560 nm Licht bei zuerst $-60\ \text{mV}$ und anschließend $-20\ \text{mV}$ und symmetrischen Ionenbedingungen von $110\ \text{mM}\ \text{Na}^+$ und $\text{pH}_{i/e}$ 7.2. (c) wie (b) mit erst $20\ \text{mV}$ und anschließend $-20\ \text{mV}$. (d) Relative BCECF-Fluoreszenzänderungen von Chrimson oder ausschließlich eCFP exprimierenden Zellen bei zuerst $-60\ \text{mV}$ (rot, schwarz) oder $20\ \text{mV}$ (orange, grau) und anschließend $-20\ \text{mV}$ entsprechend von (b+c) ($M \pm \text{SD}$) (e) Zeitkonstante der relativen BCECF-Fluoreszenzänderung τ_{BCECF} bei $-60\ \text{mV}$ in Abhängigkeit der maximalen Photostromamplitude (monoexponentieller Fit zur Visualisierung der Abhängigkeit). (f) Relative Änderung der BCECF-Fluoreszenz in Abhängigkeit der maximalen Photostromamplitude (biexponentieller Fit zur Visualisierung der Abhängigkeit). (g) Vergleich von τ_{BCECF} mit der Zeitkonstante des Photostromrückgangs (siehe b) $\tau_{\text{Strom,app}}$ (Die gestrichelt Linie entspricht der Erwartung identischer Zeitkonstanten.).

lässt sich hieraus schließen, dass der langsame Photostromrückgang von Chrimson keiner Inaktivierung des Kanals selbst entspricht, sondern aus einer Änderung des elektrochemischen Gradienten aufgrund einer Anreicherung oder Reduktion intrazellulärer Protonen resultiert. Als direkte Folge des veränderten Protonengradienten verschiebt sich das Umkehrpotential von Chrimson, weshalb Auswärts- oder Einwärtsströme bei $-20\ \text{mV}$ trotz zum Beginn der Messung symmetrischer Na^+ - und H^+ -Konzentration beobachtet werden.

Die Konzentration des intrazellulären Protonenpuffers sollte somit für den Verlauf des Chrimson-

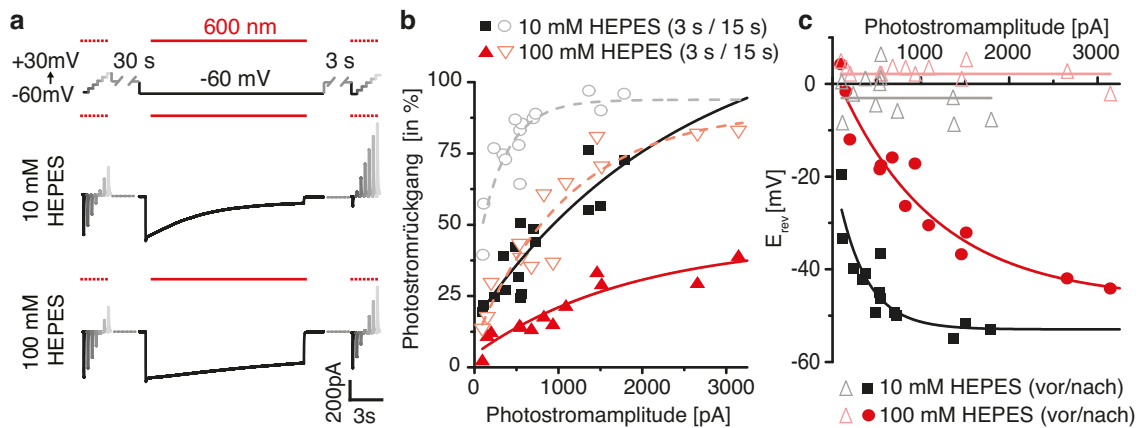


Abbildung 4.3: Abhängigkeit des Photostromrückgangs von der intrazellulären Pufferkonzentration (a) Repräsentative Photoströme von Chrimson bei Anregung mit 600 nm und intrazellulär 10 mM oder 100 mM HEPES und $pH_{i,e}$ 7,2. Das Umkehrpotential wurde durch 50 ms Lichtpulse sowohl 30 s vor als auch 3 s nach der Chrimsonaktivierung gemessen. (b) Photostromrückgang bei kontinuierlicher Belichtung mit 600 nm Licht 3 s (volle Symbole) oder 15 s (offene Symbole) nach Beginn der Belichtung in Abhängigkeit der maximalen Photostromamplitude bei intrazellulär 10 mM HEPES (schwarz) oder 100 mM HEPES (rot). (c) Umkehrpotential des Chrimsonphotostroms mit intrazellulär 10 mM HEPES (schwarz) oder 100 mM HEPES (rot) 30 s vor (offen) oder 3 s nach langer Aktivierung bei -60 mV (geschlossen).

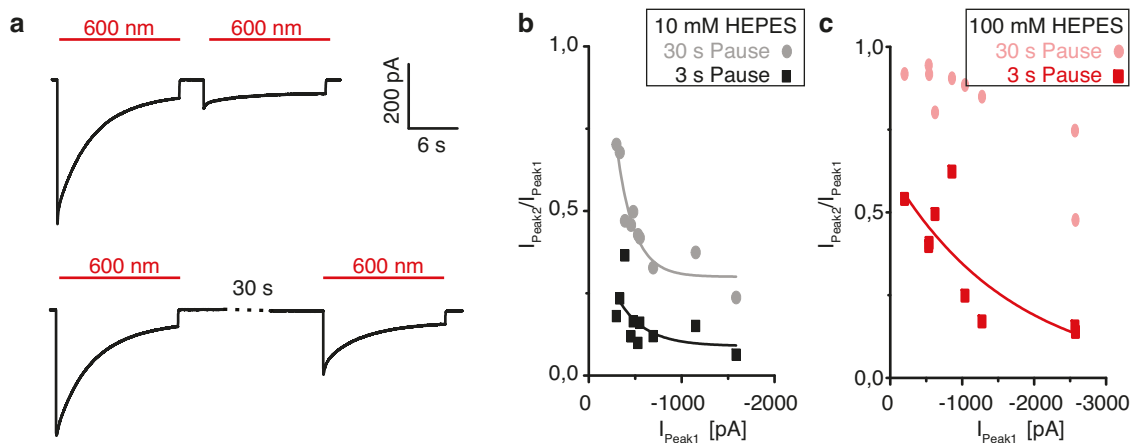


Abbildung 4.4: Erholung des Photostroms von Chrimson (a) Repräsentative Photoströme einer Chrimson exprimierenden Zelle in symmetrisch 110 mM Na^+ , $pH_{i,e}$ 7,2 sowie 10 mM HEPES bei -60 mV und wiederholter Belichtung nach unterschiedlichen Dunkelpausen für 3 s oder 30 s. (b) Erholung des Photostroms 3 s (schwarz) und 30 s (grau) nach langer Belichtung in Abhängigkeit der ursprünglichen Photostromamplitude mit intrazellulär 10 mM HEPES. (c) Wie (b) mit intrazellulär 100 mM HEPES.

photostroms von großer Bedeutung sein. Um dies zu bestätigen wurden Chrimsonphotoströme mit verschieden stark gepufferten intrazellulären Lösungen gemessen und das Umkehrpotential durch kurze Lichtpulse 30 s vor und 3 s nach längerer Chrimsonaktivierung überprüft (Abb. 4.3 a). Tatsächlich ist der Photostromrückgang und die Umkehrpotentialverschiebung bei hoher intrazellulärer HEPES-Konzentration (100 mM HEPES) sowohl langsamer als auch weniger ausgeprägt als unter Standardbedingungen (10 mM HEPES) (Abb. 4.3 b und c). Erneut zeigt sich eine starke Abhängigkeit des Photostromrückganges und der Umkehrpotentialverschiebung von der Photostromamplitude und selbst mit 100 mM intrazellulärem HEPES kommt es zum Photostromrückgang

und einer Verschiebung des Umkehrpotentials. Der intrazelluläre Protonenpuffer könnte sich nur langsam und ungleichmäßig im Zytoplasma der Zelle verteilen und lokale pH-Wert-Änderungen weiterhin zulassen.

Die Erholung des Photostrom nach nahezu vollständigem Photostromrückgang ist insbesondere mit niedrig gepufferter Pipettenlösung langsam (Abb. 4.4 a) und der intrazelluläre pH-Wert scheint sich nur allmählich wiederherzustellen. Während jedoch mit einer Pipettenlösung von 10 mM HEPES der Photostrom auch 30 s nach der ersten Belichtung weiterhin stark reduziert ist (Abb. 4.4 b), ermöglicht eine höher gepufferte Pipettenlösung von 100 mM HEPES im gleichen Zeitbereich eine vollständige Erholung des ursprüngliche Photostroms (Abb. 4.4 c). Die Wiederherstellung des intrazellulären pH-Wertes scheint somit vorwiegend durch die Patchpipette zu erfolgen. Protonen könnten hierbei nicht frei, sondern an den Protonenpuffer gebunden in die Zelle diffundieren, was die schnellere Photostromerholung bei höherer Pufferkonzentration der Pipettenlösung erklärt.

Eine ausgeprägte intrazelluläre Ansäuerung sollte in Anbetracht der allgemein hohen Protonenselektivität von ChRs auch für andere ChRs zu beobachten sein und deren Photostromverlauf beeinflussen. Auch für die ebenfalls rotlichtaktivierbaren Kanäle ReaChR und C1V1 wurden somit gleichzeitig Photoströme bei -60 mV und Änderungen der intrazellulären BCECF-Fluoreszenz gemessen und anschließend das Umkehrpotential durch kurze Lichtpulse bestimmt (Abb. 4.5 a). Sowohl C1V1 als auch ReaChR wurden aufgrund ihrer blauverschobenen Absorption bereits durch das BCECF-Anregungslicht merklich aktiviert (Abb. 4.5 a), weshalb eine geringe Abnahme der BCECF Fluoreszenz bereits vor der 560 nm-Belichtung zur Kanalöffnung beobachtet wurde. Im Gegensatz zu Chrimson, dessen Photoströme (fast) ausschließlich langsam abnehmen, inaktivieren die Photoströme von C1V1 und ReaChR bereits innerhalb weniger Millisekunden stark. Der Abfall des Peakstroms von ReaChR und C1V1 korreliert hierbei mit keiner Änderung des intrazellulären pH-Wertes und kann nicht auf eine Änderung des elektrochemischen Gradienten zurückgeführt werden, sondern resultiert aus der Inaktivierung der ChRs selbst. Im Anschluss an die schnelle Photostrominaktivierung konnte auch für C1V1 und ReaChR ein weiterer langsamer Photostromrückgang beobachtet werden, der kinetisch mit der Abnahme der BCECF-Fluoreszenz korrelierte. Obwohl die relative Änderung der BCECF-Fluoreszenz von C1V1 und ReaChR exprimierenden Zellen im Mittel langsamer als für Chrimson (Abb. 4.5 b) erfolgt, ist sie in ihrem Betrag nach 20 s-iger Belichtung vergleichbar groß (Abb. 4.5 c).

Gleichzeitig scheint jedoch der stationäre Photostrom von C1V1 und ReaChR weniger abzunehmen als in Chrimson und der Einfluss der intrazellulären pH-Wert-Änderung auf den Photostrom könnte sich zwischen den ChRs unterscheiden (Abb. 4.5 a). Für alle drei ChRs korreliert die Umkehrpotentialverschiebungen nach längerer Belichtung mit der intrazellulären Ansäuerung und bestätigen erneut eine direkte Abhängigkeit beider Parameter (Abb. 4.5 d links). Betrachtet man ausschließlich die Umkehrpotentialverschiebungen jener Zellen, für welche eine vergleichbare Änderung der intrazellulären BCECF-Fluoreszenz erzielt wurde und entsprechend ein ähnlicher Protonengradienten über die Membran aufgebaut wurde, so zeigen Chrimson exprimierende Zellen eine signifikant größere Umkehrpotentialverschiebung als C1V1 und ReaChR exprimierende Zellen (Abb. 4.5 d rechts). Während es somit aufgrund der in ChRs allgemein effizienten Protonenleitung für alle drei Konstrukte zu einer vergleichbaren intrazellulären Ansäuerung kommt, wirkt sich der

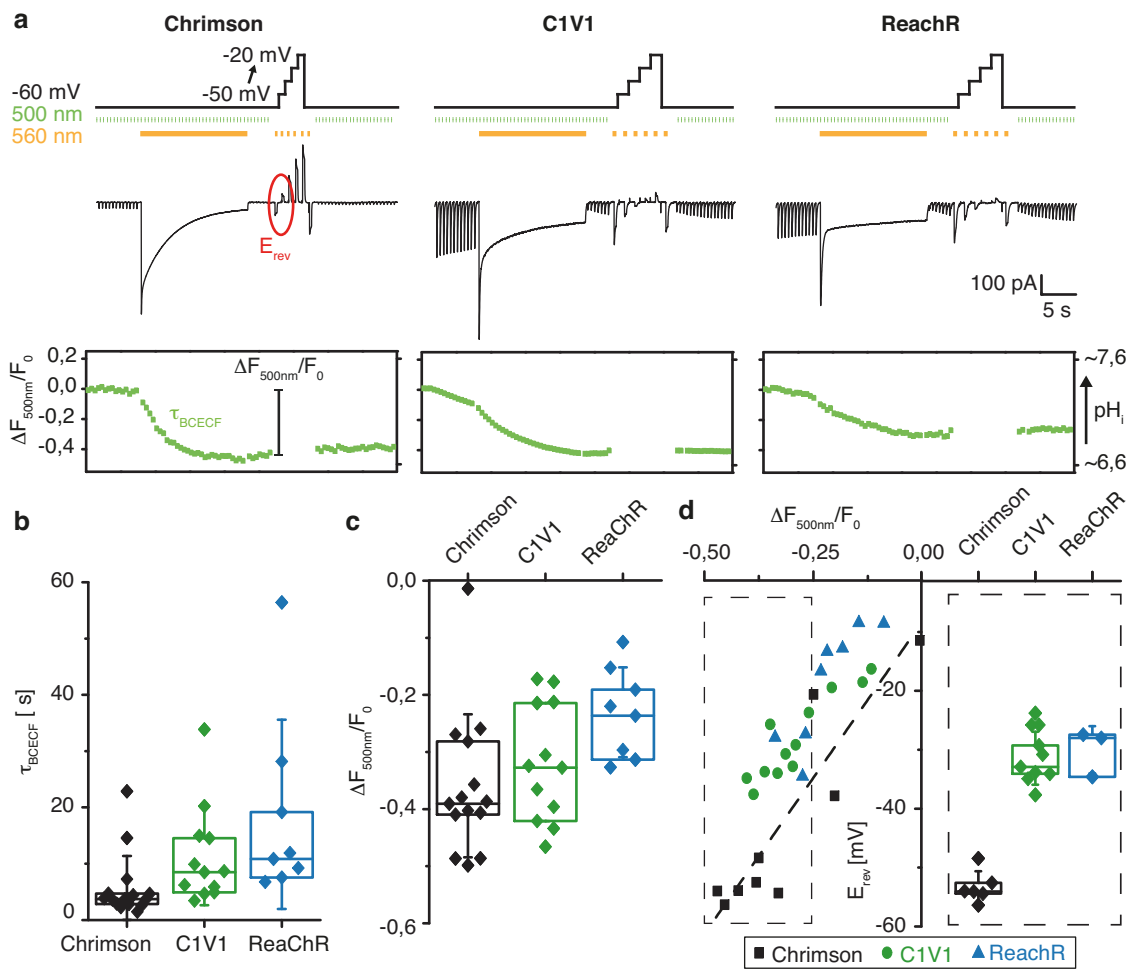


Abbildung 4.5: Vergleich der intrazellulären pH-Wert-Änderung von ChRs verschiedener Protonenselektivität (a) Repräsentative Photoströme (oben) und relative BCECF Fluoreszenzänderungen (unten) nach Belichtung mit 560 nm von Chrimson (links), C1V1 (Mitte) und ReaChR (rechts) exprimierenden HEK293-Zellen bei -60 mV und in symmetrisch 110 mM Na^+ , $\text{pH}_{i,e}$ 7,2 sowie 10 mM HEPES. Im Anschluss an die ChR-Aktivierung wurde durch kurze 50/100 ms Belichtung bei verschiedenen Spannung das Umkehrpotential der exprimierten ChRs gemessen. **(b)** Zeitkonstante der relativen BCECF-Fluoreszenzänderung nach (a) ($M \pm SD$). **(c)** Relative BCECF-Fluoreszenzänderung der in (a) dargestellten Messungen ($M \pm SD$). **(d)** Links: Umkehrpotential nach langer Belichtung in Abhängigkeit der relativen Fluoreszenzänderung gemessen wie in (a) (Die gestrichelte Linie stellt einen linearen Fit der für Chrimson gemessenen Messpunkte dar.). Rechts: Auswahl der gemessenen Umkehrpotentiale bei einer vergleichbar großen BCECF-Fluoreszenzänderung von -0.25 bis -0.5 und entsprechend ähnlicher intrazelluläre Ansäuerung (gestricheltes Kästchen links) ($M \pm SD$).

hierdurch aufgebaute Protonengradient je nach Protonenselektivität des ChRs unterschiedlich auf das Umkehrpotential und den Photostrom aus. Während der reduzierte elektrochemische Gradient für Protonen für das protonenselektive Chrimson zu einem nahezu vollständigen Verschwinden des Photostroms führt, werden in C1V1 und ReaChR Einwärtsphotoströme weiterhin durch monovalente Kationen wie Na^+ getragen und größere stationäre Photoströme bleiben auch bei einer Änderung des intrazellulären pH-Wertes erhalten.

4.2 Der rotlichtaktivierte Protonenkanal Chrimson

Das rotlichtaktivierte Chrimson zeigt nicht nur eine hohe Protonenselektivität, sondern ist auch in optogenetischen Anwendungen sowie für das mechanistische Verständnis von ChRs von besonderem Interesse. Die molekularen Bestimmungsfaktoren der rotverschobenen Proteinabsorption, der hohen Protonenselektivität sowie der schnellen Photostromkinetik sind unbekannt und werden im folgenden Abschnitt elektrophysiologisch untersucht.

4.2.1 Chrimsonvarianten zur verbesserten Membranlokalisation

Zusätzlich zum Chrimson WT aus *Chlamydomonas noctigama* werden aktuell drei weitere Chrimsonvarianten verwendet. Der Austausch des Chrimson N-Terminus durch den N-Terminus von CsChR aus *Chloromonas subdivisa* verbesserte die Membranexpression in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* [Klapoetke et al., 2014] und Sf9 Insektenzellen [Oda et al., 2018]. Das Einfügen des N-Terminus von CrChR1 aus *Chlamydomonas reinhardtii* ermöglichte die Ausbildung hochaufgelöst-streuender Proteinkristalle [Oda et al., 2018]. Die Fusion der ersten 105 Aminosäuren der β -Untereinheit der H^+/Na^+ -ATPase aus dem Rattenmagen verbesserte schließlich die Expression von BR in HEK293-Zellen und *Xenopus laevis* Oozyten [Geibel et al., 2001] und wurde auch in dieser Arbeit zur Verbesserung der Membranexpression von Chrimson verwendet.

Für einen direkten Vergleich der vier Chrimsonvarianten (Chrimson, β HKChrimson, CsChrimson und C1Chrimson) wurden diese mit einem cyan-fluoreszierenden Protein C-terminal fusioniert und in HEK293-Zellen exprimiert (Abb. 4.6 a). Alle vier Konstrukte können mit 600 nm-Licht bei verschiedenen Spannungen aktiviert werden und koloalisieren mit dem Rhodamin-18-Membranmarker in der Plasmamembran von HEK293-Zellen in konfokal-mikroskopischen Aufnahmen (Abb. 4.6 b). Die N-terminalen Modifikationen führten auch in HEK-Zellen zu einer signifikant verbesserten Membranexpression - insbesondere für das CsChrimson-Konstrukt (Abb. 4.6 c). Auch die Photostromdichten (als maximalen Photostromamplitude bei pH_e 7,2 normiert auf die Zellkapazität) waren sowohl für CsChrimson als auch für C1Chrimson und in einzelnen Fällen auch für β HKChrimson deutlich größer als für den Chrimson WT (Abb. 4.6 d). Unterschiede in der Photostromkinetik und den Aktionsspektren der verschiedenen Chrimsonvarianten sind hingegen klein bzw. für den Chrimson WT und β HKChrimson nicht zu beobachten (Abb. 4.6 e und f). Ausschließlich in CsChrimson und C1Chrimson wurde bei pH_e 7,2 eine 1,5- bis 2-fach langsamere Schließkinetik sowie eine leicht erhöhte Blaulichtsensitivität beobachtet (Abb. 4.6 e und f sowie Tab. A.2). Insbesondere die hohe Protonenselektivität ist schließlich in allen vier Chrimsonvarianten unverändert (Abb. A.1).

Im Weiteren wird für die Basischarakterisierung die Chrimsonvariante β HKChrimson verwendet (dargestellt in Abb. 4.2 bis 4.5, Abb. 4.6 bis 4.9 und Abb. A.1 bis 4.9). Für die Untersuchung des Photozyklus und als Grundlage aller Chrimson-Mutanten wird hingegen auf das auch spektroskopisch besser untersuchbare CsChrimson zurückgegriffen (dargestellt in Abb. 4.6 und Abb. 4.10 bis 4.18). Zur Vereinfachung werden im Folgenden alle verwendeten Chrimson-Konstrukte unabhängig von der N-terminalen Modifikation ausschließlich als „Chrimson“ beschrieben.

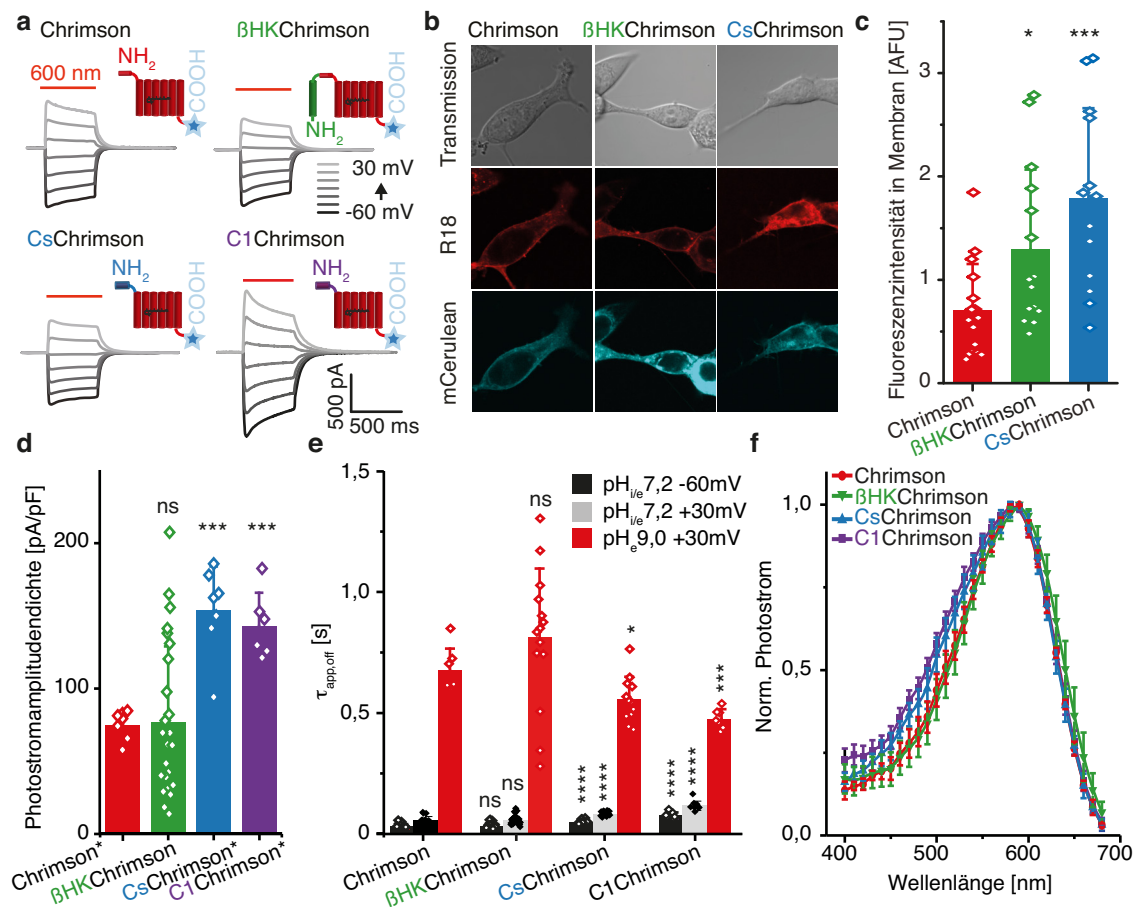


Abbildung 4.6: Chrimsonvarianten verschiedener N-Termini (a) Repräsentative Photoströme von Chrimson WT (oben links), β HKChrimson mit den N-Terminal-fusionierten ersten 105 Aminosäuren der β -Untereinheit der H^+/Na^+ -ATPase aus dem Rattenmagen (oben rechts), CsChrimson mit dem extrazellulären N-Terminus von CsChR aus *Chloromonas subdivisa* (unten links) sowie C1Chrimson mit dem extrazellulären N-Terminus von CrChR1 aus *Chlamydomonas reinhardtii* (unten-rechts) C-terminal fusioniert mit den blau fluoreszierenden Proteinen eCFP oder mCerulean3.0. Alle Messungen in symmetrisch 110 mM Na^+ und $pH_{i,e}$ 7,2. (b) Konfokale Mikroskopieaufnahmen der in HEK293 exprimierte Chrimsonvarianten in Weißlicht (oben), nach Anregung des Membranmarkers Rhodamin 18 mit 559 nm (Mitte), nach Anregung des fusionierten Fluorophors mCerulean3.0 mit 440 nm (unten). (c) mCerulean3.0-Fluoreszenz in der Membran (verglichen zum Chrimson WT) (d) Photostromdichte der Chrimsonvarianten in HEK293 (verglichen zum Chrimson WT; Mit * markierte Konstrukte wurden am selben Tag gemessen). (e) Apparente Schließkinetik der ChRs in symmetrisch 110 mM Na^+ und pH_e 7,2 bei -60 mV (schwarz) und 30 mV (grau) sowie bei pH_e 9,0 und 30 mV (rot) mit intrazellulär pH_i 7,2. (f) Aktionsspektren der Chrimsonvarianten nach 10 ms Belichtungen mit verschiedenen Lichtfarben und gleicher Photonendichte entsprechend der Ionenbedingungen aus (a). (c) bis (f) stellen $M \pm SD$ dar. Die genauen Werte und Anzahl der gemessenen Zellen sind in Tab. A.2 gegeben.

4.2.2 pH-Abhängigkeit des Chrimsonphotostroms unter längerer Belichtung

Zusätzlich zur hohen Protonenselektivität ist der Chrimsonphotoströme in seiner Kinetik und Lichtsensitivität stark pH-abhängig. Zur ersten Betrachtung der Photostromkinetik wurden Strom-Spannungskurven bei 600 nm Belichtung bei drei unterschiedlichen extrazellulären pH-Werten aufgenommen (Abbildung 4.7 a). Entsprechend der hohen Protonenselektivität führte eine Erhöhung der extrazellulären H^+ -Konzentration durch einen Pufferwechsel zu pH_e 5,0 zu einer

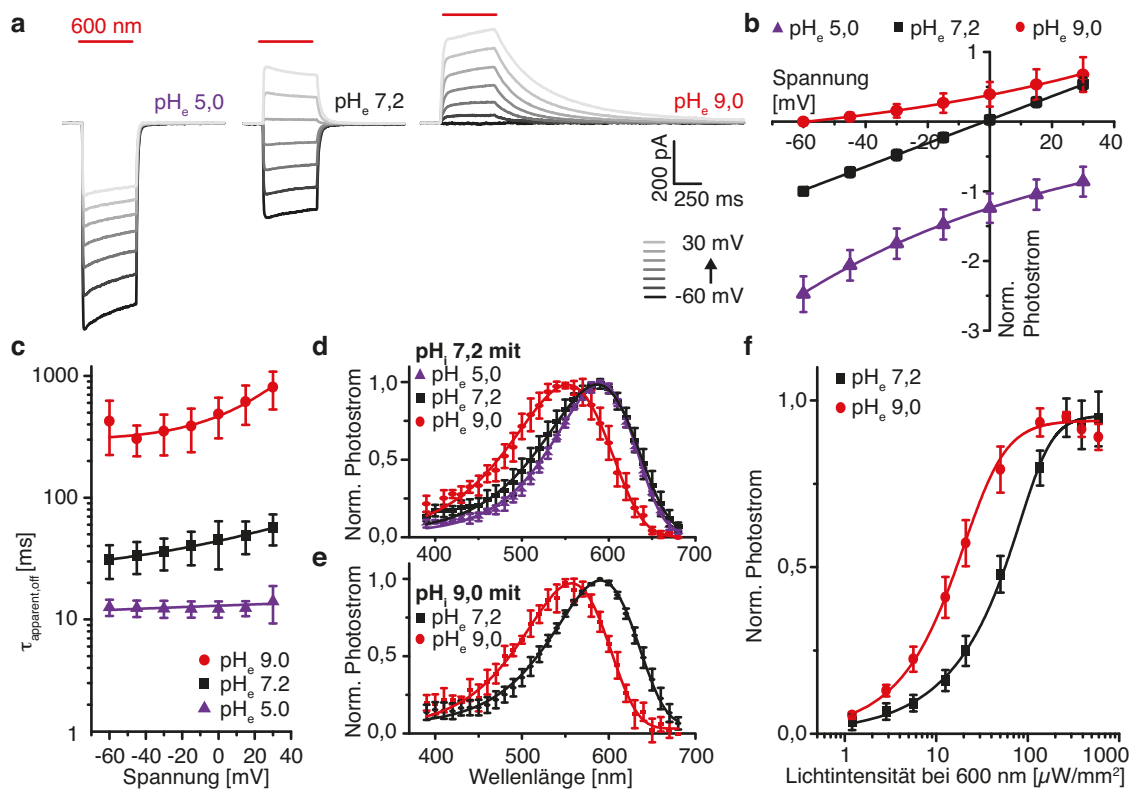


Abbildung 4.7: pH-Abhängigkeit des Chrimsonphotostroms (a) Repräsentative Photoströme von Chrimson bei verschiedenen extrazellulären pH_e mit symmetrisch 110 mM Na^+ und pH_i 7,2. (b) Strom-Spannungskurven der Messung in (a) ($M \pm SD$, $n=8-37$) (c) Apparente Schließkinetik von Chrimson unter den Bedingungen von (a) ($M \pm SD$, $n=8-37$). (d) Aktionsspektren von Chrimson bei verschiedenen extrazellulären pH-Werten mit intrazellulär pH_i 7,2 ($M \pm SD$, symmetrisch 110 mM Na^+ , -60 mV bei pH_e 5,0-7,2 und 30 mV bei pH_e 9,0, $n=4-9$). (e) Aktionsspektren von Chrimson bei verschiedenen extrazellulären pH-Werten mit intrazellulär pH_i 9,0 ($M \pm SD$, symmetrisch 1 mM Na^+ , 30 mV, $n=4-5$). (f) Lichttitration des maximalen Photostroms bei 500 ms Belichtung und unterschiedlichem extrazellulären pH_e -Wert ($M \pm SD$, symmetrisch 110 mM Na^+ , pH_i 7,2 und -60 mV bei pH_e 7,2 sowie 30 mV bei pH_e 9,0).

deutlichen Zunahme der Einwärtsströme, wohingegen bei einer Reduktion der extrazellulären H^+ -Konzentration (pH_e 9,0) Einwärtsströme - wie bereits gezeigt - nahezu vollständig verschwanden. In beiden Fällen sind die Umkehrpotentiale deutlich verschoben und liegen für pH_e 5,0 außerhalb des Messbereiches (Abb. 4.7 b). Die bei allen pH_e -Werten biphasische Kanalschließkinetik konnte biexponentiell angeglichen und durch eine apparente Zeitkonstante (τ_{app}) zusammengefasst werden (Abb. 4.7 c). Das Kanalschließen ist bei saurem pH-Wert deutlich beschleunigt und bei steigendem pH-Wert zunehmend spannungsabhängig. Genau wie in *CrChR2* [Berndt, 2011] wird auch in Chrimson die Schließkinetik bei positiven Spannungen langsamer.

Zur Bestimmung der Farbsensitivität wurden Photostromamplituden nach 10 ms Anregung mit Licht unterschiedlicher Wellenlänge jedoch gleicher Photonenzahl gemessen und anschließend auf den maximalen Photostrom normiert und als Aktionsspektrum gegen die Anregungswellenlänge aufgetragen (Abbildung 4.7 d+e). Während sich das Aktionsspektrum beim Übergang von pH_e 5,0 zu pH_e 7,2 kaum ändert, kommt es beim Übergang zu pH_e 9,0 zu einer hypsochromen Verschiebung um ~ 30 nm (Abb. 4.7 d). Die Farbverschiebung des Aktionsspektrums erfolgt unabhängig

vom intrazellulären pH-Wert sowohl bei pH_i 7,2 als auch bei pH_i 9,0 (Abb. 4.7 e) und könnte auf die Protonierung (einer) extrazellulär zugänglicher Aminosäure(n) zurückzuführen sein.

Zur Bestimmung der Lichtsensitivität wurden anschließend Belichtungsintensitäten bei 500 ms Anregung mit 600 nm Licht titriert und Photoströme bei -60 mV (pH_e 7,2) oder 30 mV (pH_e 9,0) gemessen (Abb. 4.7 f). Überraschenderweise werden halbmaximale Photoströme bei pH_e 9,0 trotz des hypsochrom verschobenen Aktionsspektrums bereits bei niedrigerer Lichtintensität als bei pH_e 7,2 erreicht. Insbesondere die langsame Schließkinetik bei pH_e 9,0 könnte hier die Kanalöffnung bei niedrigeren Lichtintensitäten auch abseits des Absorptionsmaximums begünstigen.

4.2.3 Ionenselektivität von Chrimson

Im Gegensatz zu *CsChR* konnte für Chrimson eine Restkationleitfähigkeit beobachtet werden (Abb. 4.1). Diese kann insbesondere bei niedrigen Protonenkonzentrationen untersucht werden, wo Protonenströme reduziert sind. Für optogenetische Anwendungen ist hingegen die Ionenleitung bei neutralem pH-Wert von Belangen. Die Ionenselektivität von Chrimson wurde somit mit drei unterschiedlichen intrazellulären Lösungen untersucht (Abb. 4.8 a, Einschub). Diese enthielten entweder - wie in den vorigen Messungen - eine hohe H^+ - und hohe Na^+ -Konzentration (110 mM Na^+ und pH_i 7,2, schwarz) oder waren in ihrer Protonenkonzentration (110 mM Na^+ und pH_i 9,0, rot) beziehungsweise in ihrer Protonen- und Natriumkonzentration reduziert (1 mM Na^+ und pH_i 9,0, grün). Für alle drei intrazellulären Ionenbedingungen wurden Strom-Spannungskurven bei roter Belichtung (600 nm für 500 ms) aufgenommen und - ausgehend von symmetrischen Ionenbedingungen - die extrazelluläre Lösung gegen Puffer unterschiedlicher Kation- und Protonenzusammensetzung ausgetauscht.

Bei niedriger Protonenkonzentration von $\text{pH}_{i/e}$ 9,0 führt die Erhöhung der extrazellulären Kationkonzentration von 1 mM zu 110 mM Na^+ unabhängig von der intrazellulären Kationkonzentration zu einer 2-4-fachen Erhöhung des Einwärtsphotostroms bei -60 mV (Abbildung 4.8 a-d). Eine Erhöhung der extrazellulären Protonenkonzentration bei einem Wechsel von pH_e 9,0 zu pH_e 7,2 führt hingegen zu 20-30-mal größeren Einwärtsströmen. Gleichzeitig ist sowohl bei der Erhöhung der Konzentration monovalenter Kation als auch bei einer Erhöhung der extrazellulären Protonenkonzentration das Umkehrpotential deutlich verschoben und bestätigt die Leitung von Na^+ , K^+ und insbesondere H^+ (Abb. 4.8 e). Interessanterweise erfolgte die Einwärtsstromzunahme nach Absenken von pH_e nicht unmittelbar nach Pufferwechsel - wie es aufgrund der hohen Protonenselektivität zu erwarten wäre - sondern nahm bei wiederholter Belichtung etappenweise zu (Abb. 4.8 b, Einsatz). Die Protonierung einer extrazellulär zugänglichen Aminosäure könnte hierbei das Gleichgewicht verschiedener Dunkelzustände verschieben und gemeinsam mit der hohen Protonenleitfähigkeit zur Photostromzunahme bei pH 7,2 beitragen.

Photostromabnahme und Umkehrpotentialverschiebung nach Austausch von Na^+ durch K^+ (Abbildung 4.8 c) sind nahezu vollständig auf das gleichzeitig beim Pufferaustausch zu beachtende Diffusionspotential zurückzuführen und die Unterschiede sind nach Korrektur beider Parameter klein (Abbildung 4.8 d+e). Somit kann von einer gleichen Leitfähigkeit für Na^+ und K^+ ausgegangen werden. Bei einem Austausch von Na^+ durch Mg^{2+} oder Ca^{2+} sind die Umkehrpotenti-

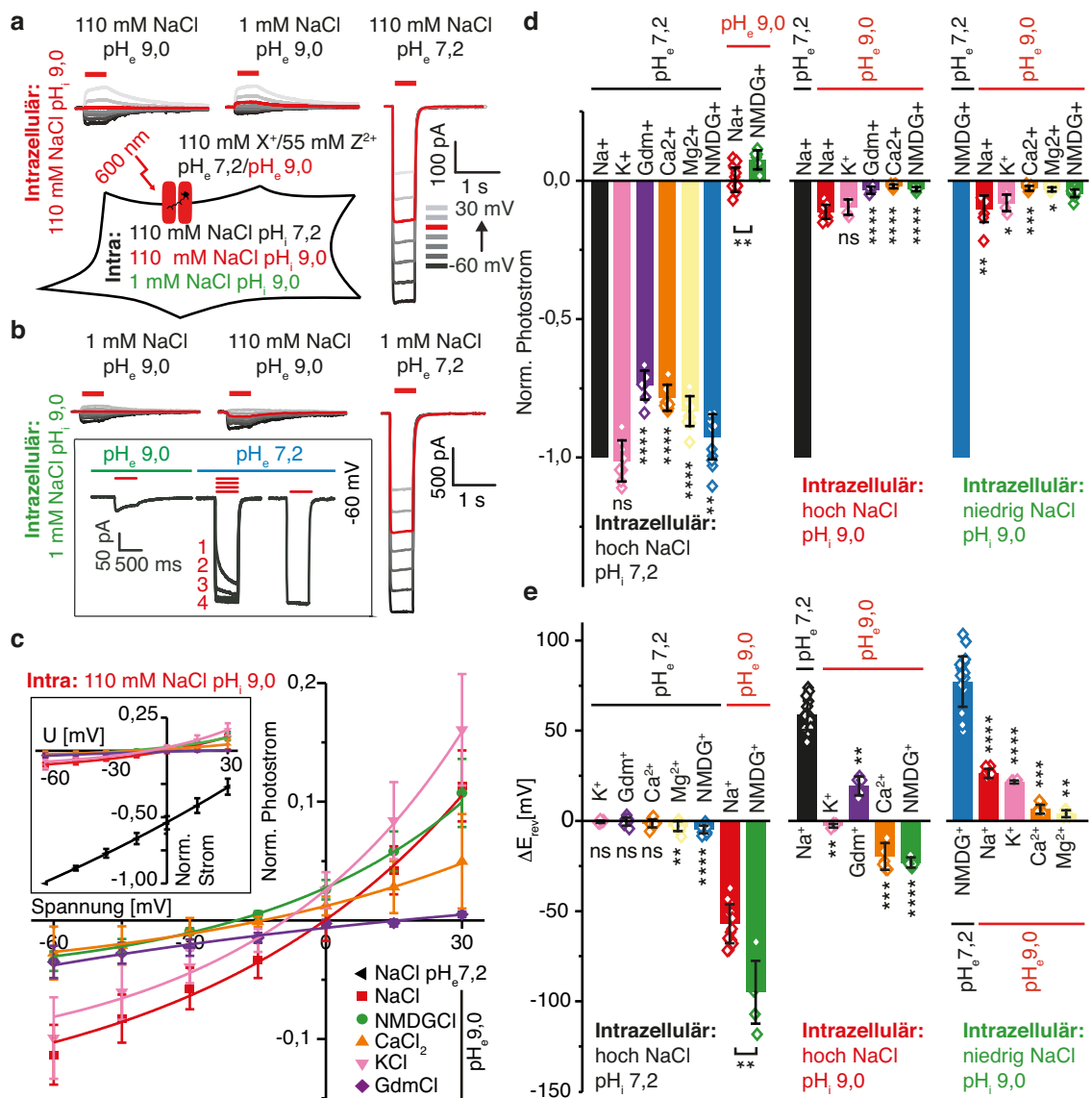


Abbildung 4.8: Ionenselektivität von Chrimson (a) Repräsentative Photoströme von Chrimson bei verschiedener extrazellulärer Na⁺- und H⁺-Konzentration mit intrazellulär 110 mM Na⁺ und pH_i 9,0. Einsatz: Skizze der in dieser Abbildung in HEK293 Zellen verwendeten intra- und extrazellulären Ionenkonzentrationen: Verschiedene monovalente Kationen mit 110 mM oder divalente Kationen mit 55 mM und pH_e 7,2 oder pH_e 9,0. (b) Repräsentative Photoströme mit intrazellulär 1 mM Na⁺ und pH_i 9,0. Einsatz: Langsame Zunahme des Photostroms nach Absenken des extrazellulären pH-Wertes von pH_e 9,0 auf pH_e 7,2 und mehrfacher Belichtung. (c) Stromspannungskurven normierter Photoströme entsprechend der Messungen in (a) (M ± SD, n=5-17). (d) Normalisierte Photoströme bei -60 mV und verschiedenen extrazellulären Kationenkonzentrationen sowie pH_e-Werten (110 mM Na⁺/K⁺/Gdm⁺/NMDG⁺ oder 55 mM Ca²⁺/Mg²⁺ bei pH_e 7,2 oder pH_e 9,0) mit intrazellulär 110 mM Na⁺ und pH_i 7,2 (links), 110 mM Na⁺ und pH_i 9,0 (mitte) und 1 mM Na⁺ und pH_i 9,0 (rechts) (M ± SD). (e) Umkehrpotentialverschiebung nach Austausch extrazellulärer Kationen bzw. Wechsel des extrazellulären pH-Wertes im Bezug zu jeweils symmetrischer intra- und extrazellulärer Na⁺- und H⁺-Konzentration (M ± SD).

alverschiebungen vergleichbar zu jenen eines Austausches gegen das von ChRs nicht geleiteten organischen Kations NMDG⁺ (Abbildung 4.8 c+e). Gleichzeitig sind die Photostromamplituden bei hoher Konzentration divalenter Kationen im Vergleich zu extrazellulären Puffern mit NMDG⁺

sogar reduziert. Divalente Kationen scheinen somit nicht nur kaum (bis gar nicht) geleitet zu werden, sondern blockieren außerdem (bei hoher Konzentration) den verbleibenden Protonenstrom (Abb. 4.8 d).

Einen noch ausgeprägteren Block des Protoneneinstroms bei -60 mV wurde nach Zugabe des organischen Kations Guanidinium beobachtet (Abbildung 4.8 c+d), welches in *CrChR2* das am besten geleitete Ion darstellt [Nagel et al., 2003] (siehe auch Abb. A.2). Obwohl die Photoströme für 110 mM Gdm^+ sowohl bei $\text{pH}_e 7,2$ als auch bei $\text{pH}_e 9,0$ reduziert sind, konnte insbesondere bei $\text{pH}_e 9,0$ eine deutliche Umkehrpotentialverschiebung von ~ 40 mV bei einer Substitution von NMDG^+ und ~ 20 mV bei einem Austausch von Na^+ durch Gdm^+ gemessen werden (Abbildung 4.8 e Mitte). Im Gegensatz zu Ca^{2+} scheint somit Gdm^+ bei alkalischen pH-Werten auch von Chrimson geleitet zu werden. Die Transportrate wäre hierbei jedoch äußerst niedrig und würde die gleichzeitige Leitung andere Ladungsträger verhindern.

Auch in *CrChR2* führte der gleichzeitige Transport von Protonen, mono- und divalenten Kationen zur Konkurrenz verschiedener Ionen um gleiche Bindungsstellen [Gradmann et al., 2011, Schneider et al., 2013]. Entsprechend werden für *CrChR2* große Natriumströme bei alkalischem pH-Wert gemessen, welche bei einer Erhöhung der extrazellulären Protonenkonzentration zugunsten zunehmender Protonenströme abnehmen, während gleichzeitig der Gesamtphotostrom nahezu konstant bleibt [Gradmann et al., 2011]. Im Gegensatz dazu sind in Chrimson Na^+ -Einwärtsströme bei alkalischem pH-Wert klein (Abb 4.9 a) und bei einer Erhöhung der extrazellulären Protonenkonzentration nimmt sowohl der Protonenstrom als auch der Gesamtphotostrom zu - sowohl mit als auch ohne extrazelluläres Na^+ (Abb. 4.9 a und b). Während der bei niedrigen pH-Werten abnehmende Unterschied des Umkehrpotentials mit und ohne Na^+ -Gradient (Abb. 4.9 c) eine Reduktion des relativen Anteils von Na^+ am Gesamtphotostrom widerspiegelt (Abb. 4.9 d Einschub offene Säulen), zeigt ein Vergleich der normierten Photostromamplituden (Abb. 4.9 d), dass zumindest bei alkalischem und neutralem pH-Wert der absolute Beitrag von Natrium zum Gesamtphotostrom nahezu konstant bleibt (Abb.4.9 d Einschub gefüllte Säulen). Anders als in *CrChR2* könnten somit in Chrimson H^+ und Na^+ unabhängig voneinander geleitet werden. Bei saurem pH_e sind schließlich keine Unterschiede der Photoströme mit und ohne extrazelluläres Na^+ mehr zu beobachten (Abb. 4.9 b und d) und der Beitrag von Na^+ zum Photostrom wird experimentell nicht mehr aufgelöst.

Um auszuschließen, dass bei physiologischem pH-Wert eine residual vorhandene Kalziumleitfähigkeit durch den erheblich größeren Protonenstrom überdeckt wird, wurden Kalziumkonzentrationsänderungen mittels FURA-2 nach 15 s ChR-Aktivierung in 70 mM Ca^{2+} gemessen (Abb. 4.9 e links). Für *CrChR2* T159C wird unter diesen Bedingungen eine deutliche Zunahme der intrazellulären Kalziumkonzentration durch einen Anstieg des FURA-2-Fluoreszenzverhältnisses angezeigt. In Chrimson war hingegen keine Änderung der FURA-2-Fluoreszenz nach längerer Anregung zu beobachten (Abb. 4.9 e rechts). Unter gleichen Messbedingungen sind die Photostromamplituden von Chrimson und *CrChR2* vergleichbar groß (Abb. 4.9 e Einschub). Anders als *CrChR2* leitet Chrimson somit kein Kalzium.

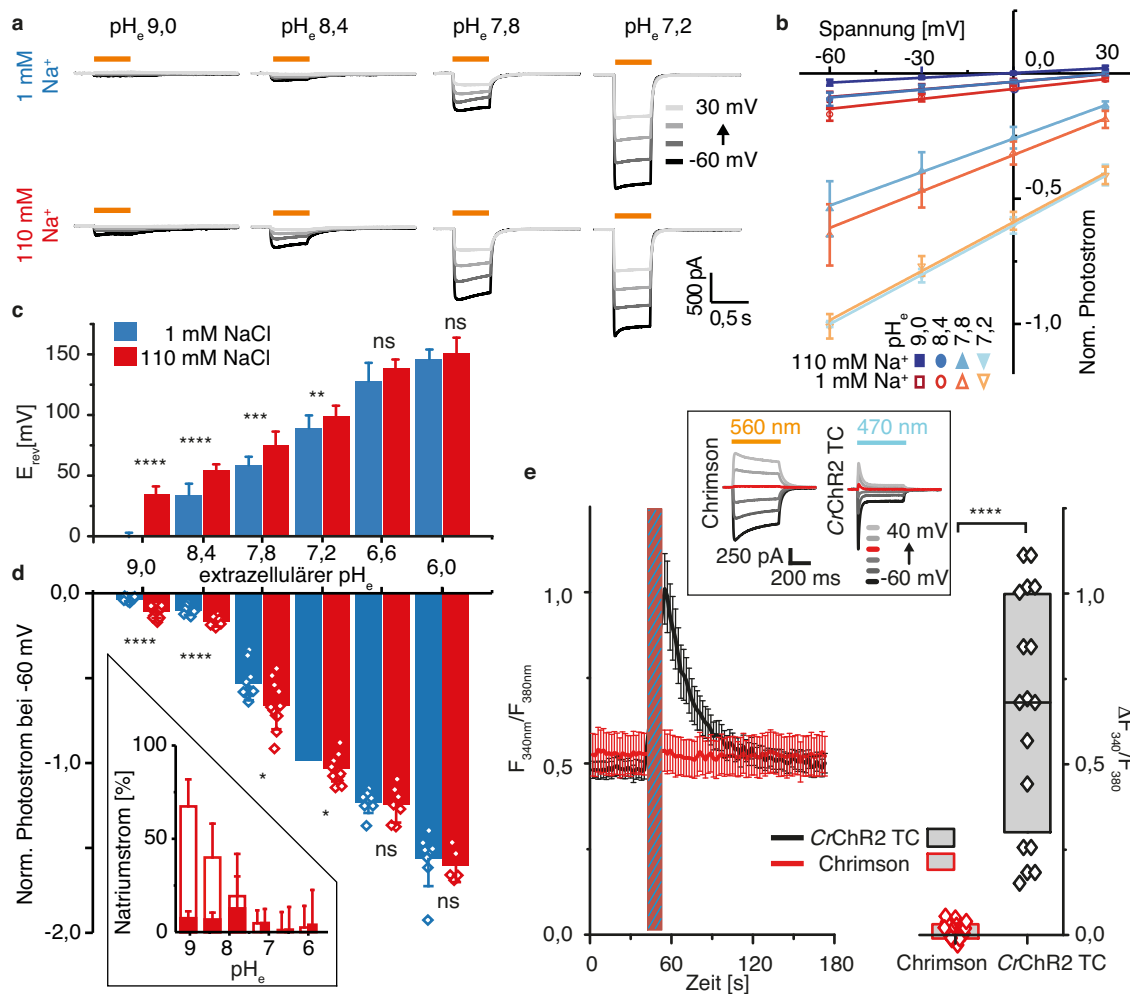


Abbildung 4.9: H⁺-Na⁺-Kompetition und Kalziumleitfähigkeit von Chrimson (a) Repräsentative Photoströme bei verschiedenen pH_e und niedriger (blau, oben) oder hoher (rot, unten) extrazellulärer Na⁺-Konzentration mit intrazellulär 1 mM Na⁺ und pH_i 9,0. (b) Strom-Spannungskurven der Messungen aus (a) (M ± SD, n=5-40). (c) Umkehrpotentiale nach (a) (M ± SD, teilweise linear extrapoliert, n=5-40). (d) Normierte Photostromamplituden nach (a) (M ± SD). Einschub: Anteil des Na⁺-Stroms am Gesamtstrom je nach pH_e-Werte (offene Säulen) oder einheitlich auf den gleichen Wert normierter Na⁺-Strom bei verschiedenen pH_e-Werten (gefüllte Säulen) berechnet nach $I_{Na}(pH_e x) = (I(110 \text{ mM NaCl}, pH x) - I(1 \text{ mM NaCl } pH x)) / I(110 \text{ mM NaCl } pH x \text{ oder } pH 7,2)$. (e) Kalziumkonzentrationsbildung mit FURA-2 von Chrimson (rot) und CrChR2 T159C (grau) exprimierenden HEK293 Zellen. **Links:** Fura-2-Fluoreszenz-Verhältnisse nach Anregung mit 340 nm und 380 nm Licht sowie 15 s Aktivierung des ChRs mit 560 nm oder 470 nm (gestreifter Balken). Die extrazelluläre Lösung enthielt 70 mM CaCl₂ bei pH_e 7.2 (M ± SE). **Rechts:** Maximale Fluoreszenzänderung nach Kanalrhodopsinaktivierung (M ± SD). **Einschub:** Repräsentative Photoströme unter den FURA-2 Messbedingungen.

4.2.4 Molekulare Bestimmungsfaktoren der Ionenleitung von Chrimson

Ein mehr als 100 nm bathochrom verschobenes Aktionsspektrum im Vergleich zu CrChR2, eine schnelle Schließkinetik trotz nicht konserviertem DC-Paar sowie eine hohe Protonenselektivität und reduzierte Leitfähigkeit für organische und divalente Kationen weisen auf erhebliche Unterschiede der direkten Umgebung des Retinal Chromophors, des Kanalschließmechanismus sowie der Konfiguration der ionenleitenden Pore von Chrimson hin. Mit Hilfe ortsgerechter

Mutagenese und der in Kooperation zu dieser Arbeit gelösten Kristallstruktur des Chrimson-Dunkelzustandes [Oda et al., 2018] können im folgenden die molekularen Bestimmungsfaktoren der bathochromen Proteinabsorption, der schnellen Schließkinetik sowie der hohen Protonenleitfähigkeit von Chrimson identifiziert werden. Photoströme der verschiedenen Mutanten wurden bei intra- und extrazellulär 110 mM NaCl und $\text{pH}_{i/e}$ 7,2 und 500 ms Anregung im Aktionsmaximum der Mutanten gemessen, die Photostromdichte bei -60 mV bestimmt sowie das Kanalschließen biexponentiell angeglichen und durch eine apparente Zeitkonstante zusammengefasst ($\tau_{\text{apparent,off}}$). Aktionsspektren wurden mit 10 ms Lichtpulsen unterschiedlicher Wellenlängen und gleicher Photonendichten bei -60 mV gemessen und die Wellenlänge des Aktionsmaximums (λ_{max}) durch Angleichen einer parametrischen Weibullfunktion bestimmt. Änderungen der Ionenselektivität wurden durch die Messung von Stromspannungskurven in unterschiedlichen extrazellulären Puffern untersucht und durch normalisierte Stromamplituden und relative Umkehrpotentialverschiebungen quantifiziert. Die biophysikalischen Kenngrößen der Mutanten - wie Photostromdichte, Wellenlänge maximaler Photostromaktivität, Photostromkinetik und relative Photostromamplituden sowie Umkehrpotentialverschiebungen nach Änderung des Na^+ - und H^+ -Gradienten sind zusätzlich im Anhang in den Tabellen A.3 und A.4 zusammengefasst.

4.2.5 Die Retinalbindetasche von Chrimson

Die direkte Umgebung des Retinalchromophors von Chrimson ähnelt in Helix 3 - nahe der ionenleitenden Pore - anderen ChRs, wohingegen Aminosäuren der Retinalbindetasche in Helix 4 bis 7 den Resten der Protonenpumpe BR entsprechen (Abb. 4.10 a). Im Grenzbereich von Helix 3 und 4 unterscheiden sich S169 (nahe dem Gegenion) und C198 (im DC-Paar) (grün) sowohl von *CrChR2* (T127/D156) als auch von BR (T89/D115).

Mutationen des DC-Paares führten in *CrChR2* und anderen ChRs zu einem langsamen Kanalschließen mit Zeitkonstanten von mehreren Minuten [Bamann et al., 2010, Berndt et al., 2009, 2014, Dawydow et al., 2014, Hososhima et al., 2015, Krause et al., 2017]. In Chrimson ist die Photostromkinetik hingegen auch ohne konserviertes DC-Paar schnell. Auch die Mutation C170A (C128 in *CrChR2*) führt nur zu einer geringen Verlangsamung des Kanalschließens (Abb. 4.10 b-d) im Gegensatz zu homologen Mutationen in *CrChR2* [Berndt et al., 2009], C1C2 [Hososhima et al., 2015], iC1C2 [Berndt et al., 2014] oder ReaChR [Krause et al., 2017]. Das Wiedereinfügen des DC-Paares durch die Mutation C198D beschleunigt die Photostromkinetik und könnte das DC-Paar rekonstituieren (Abb. 4.10 b und d). Gleichzeitig ist allerdings die Photostromdichte von C198D stark reduziert (Abb. 4.10 c) und auch die Porenbildung könnte eingeschränkt sein. Von großer Bedeutung für das Schließen des Kanals - an Stelle des DC-Paares - ist hingegen in Chrimson das benachbarte M201. Für alle Mutanten von M201 ist das Kanalschließen um wenigstens zwei Größenordnungen verlangsamt (Abb. 4.10 b und d). Die effiziente Protonenleitung von Chrimson erschwert hierbei die genaue Bestimmung der Schließkinetik, da entsprechend Abschnitt 4.1.2 bei längerer Porenöffnung zusätzlich zum Kanalschließen auch die Reduktion des Protonengradienten aufgrund einer intrazellulären pH-Wert-Änderung zum Rückgang des Photostroms beiträgt. Zur Vermeidung intrazellulärer pH-Wert-Änderungen wurden HEK-Zellen bei

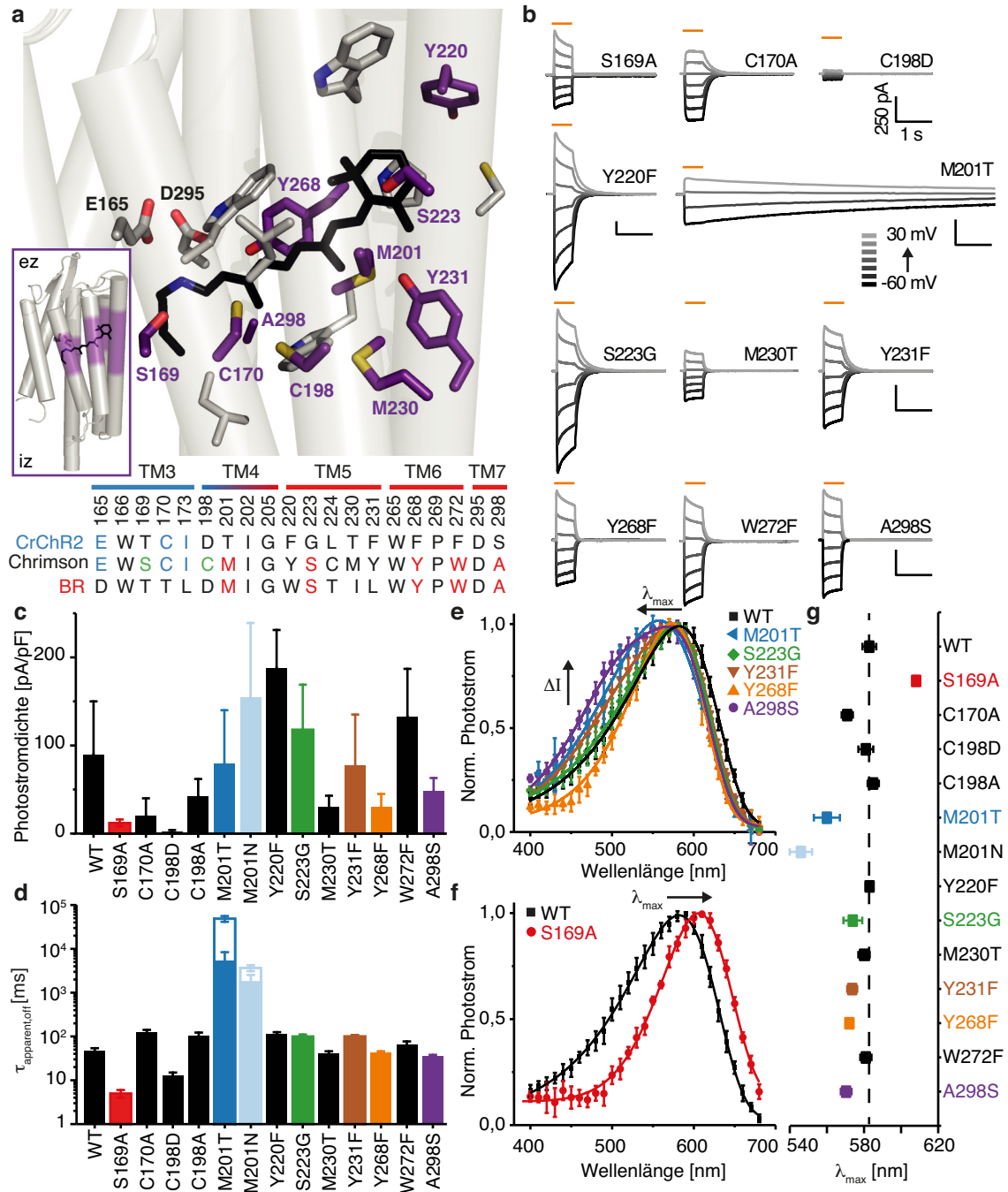


Abbildung 4.10: Chromson-Mutanten der Retinalbindetasche (a) Aminosäuren in direkter Umgebung des Retinalchromophors in der C1Chrimson-Dunkelstruktur (PDB: 5zih) [Oda et al., 2018] (oben) und Aminosäuresequenzvergleich mit CrChR2 und BR (unten). (b) Repräsentative Photostrome von Chromson-Mutanten der Retinalbindetasche bei 110 mM Na⁺ und pH_{i,e} 7,2 sowie 580 nm Belichtung. (c) Photostromdichten der Chromson-Mutanten in HEK293 unter den Messbedingungen von (b). (d) Apparente Schließkinetik der Kanalmutanten unter den Messbedingungen von (b). Offene Säulen repräsentieren die Schließkinetik des Kanals, die mit Hilfe von 20 ms Spannungspulsen zu -60 mV in einer Frequenz von 0,2 Hz oder 0,5 Hz gemessen wurde. (e + f) Aktionsspektren von Chromson-Mutanten nach 10 ms Belichtung und konstanter Photonendichte unter den Messbedingungen von (b). (g) Wellenlänge der maximalen Photostromaktivierung von Chromson-Mutanten in der Retinalbindetasche. Daten in (c-g) repräsentieren M ± SD. Absolute Werte und die Anzahl unabhängiger Messungen finden sich in Tab. A.3.

einer Spannung nahe ihres Umkehrpotentials (hier 0 mV) geklemmt und die Schließkinetik ausschließlich durch kurze niederfrequente Spannungspulse gemessen (Abb. 4.10 d offene Säulen). Ohne sekundären Photostromrückgang durch Abbau des elektrochemischen Protonengradienten konnte eine deutlich langsamere Schließkinetik von bis zu 50 s bestimmt werden, welche der tatsächlichen Porenschließung entspricht und für Substitutionen mit Resten einer kleinen Seitengruppengröße (M201T mit $\tau_{off} = 49 \pm 7$ s) deutlich langsamer erfolgte als mit größeren Resten (M201N mit $\tau_{off} = 3,6 \pm 0,6$ s) (Abb. 4.10 d). Das Kanalschließen der Mutante M201A konnte schließlich aufgrund eines in allen fluoreszierenden Zellen geringen Membranwiderstandes nicht bestimmt werden, was eine dauerhaft Porenöffnung der M201A Mutante nahelegt.

Die Farbabsorption mikrobieller Rhodopsine wird wesentlich durch sterische Einschränkungen und die Polarität und Polarisierbarkeit der Retinalbindetasche bestimmt [Ernst et al., 2014, La-sogga et al., 2010]. In BR verhindern M118 und S141 durch sterische Wechselwirkung mit den Methylgruppen des β -Iononringes eine Rotation um die C6-C7 Bindung und sind damit essentiell für eine planare Konfiguration des Retinalchromophors und die Ausdehnung des konjugierten π -Elektronensystems [Sudo et al., 2013]. Außerdem begünstigen polare Seitengruppen am β -Iononring sowie unpolare Aminosäuren nahe der $RSBH^+$ eine Ladungsverschiebung im angeregten Zustand und erlauben eine Anregung durch Photonen geringerer Energie [Kloppmann et al., 2005, Shimonon et al., 2000]. Entsprechend führen die Mutationen M118A, S141A und A215S zu einer deutlichen Blauverschiebung des Absorptionsmaximums in BR [Greenhalgh et al., 1993, Marti et al., 1991, Sudo et al., 2013]. Alle drei Position sind in Chrimson konserviert und auch in Chrimson führen die homologen Substitutionen M201T, S223G und A298S genau wie Y231F zu einer hypsochromen Verschiebung des Aktionsspektrums und einer Erhöhung der Blaulichtsensitivität (Abb. 4.10 e und g).

Die Mutation S169A, durch welche eine weitere polare Seitengruppe nahe der $RSBH^+$ entfernt wird, verschiebt spektakulärerweise das Aktionsspektrums um 25 nm weiter rot (Abb. 4.10 f und g). Die Chrimson S169A-Mutante (auch als ChrimsonSA bezeichnet [Oda et al., 2018]) stellt mit einer maximalen Aktivität bei 607 nm das aktuell am weitesten rotverschobene mikrobielle Rhodopsine dar, welches seine Proteinfunktion erhält und zeigt außerdem eine zehnmal schnellere Schließkinetik als der WT (Abb. 4.10 d). Eine weitere unpolare Substitution Y268F nahe der $RSBH^+$ führt schließlich zu keiner Rot- sondern zu einer Blauverschiebung des Aktivitätsmaximums. In der Kristallstruktur von Chrimson zeigt die Hydroxylgruppe von Y268 direkt auf das zweite Gegenion D295, welches es möglicherweise durch eine direkte Wasserstoffbrückenbindung (2,6 Å) in Position hält [Oda et al., 2018]. Unabhängig von der Polarität könnte Y268 entsprechend eine zusätzliche Funktion bei der Festlegung der Opsinverschiebung in Chrimson haben und unabhängig von dessen Polarität für die Konfiguration des Gegenionkomplexes von Bedeutung sein.

4.2.6 Der Gegenionkomplex von Chrimson

Besonders wichtig für die Farbabsorption mikrobieller Rhodopsine ist die Stabilisierung der protonierten $RSBH^+$ durch den Gegenionkomplex (Abb. 4.11 a).

Während in BR die Mutation D85N zu einer Anhebung des Grundzustandsenergieniveaus und

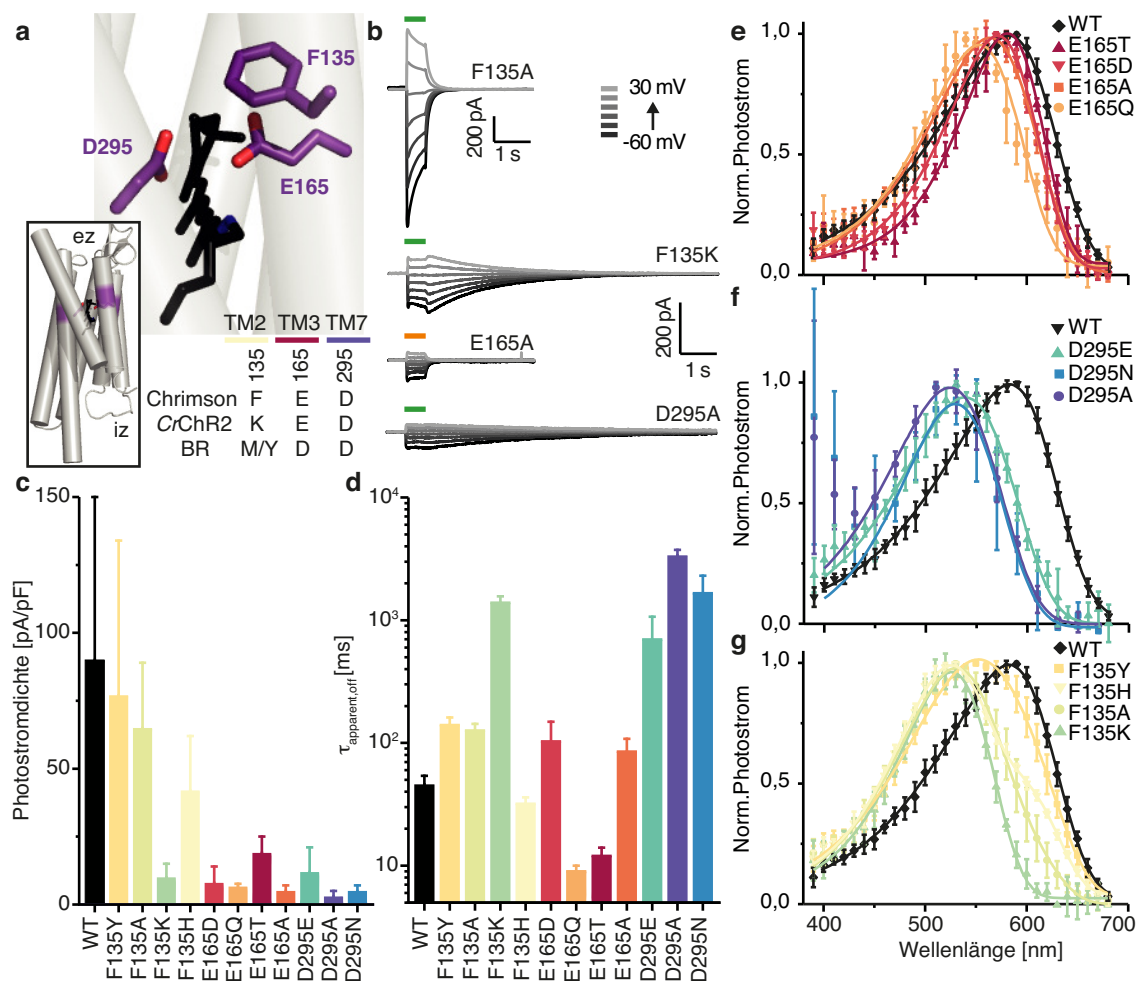


Abbildung 4.11: Chrimson-Mutanten des Gegenionkomplexes (a) Aminosäuren in direkter Umgebung der Retinal Schiffbase in der C1Chrimson-Dunkelstruktur (PDB: 5zih) [Oda et al., 2018] (oben) und Aminosäuresequenzvergleich mit CrChR2 und BR (unten). (b) Repräsentative Photoströme von Chrimson-Mutanten des Gegenionkomplexes bei 110 mM Na⁺ und pH_{i,e} 7,2 und 530 nm Belichtung (grün) oder 580 nm Belichtung (orange). (c) Photostromdichten der Chrimson-Mutanten in HEK293 unter den Messbedingungen von (b). (d) Apparente Schließkinetik der Kanalmutanten unter den Messbedingungen von (b). (e - g) Aktionsspektren von Chrimson-Mutanten nach 10 ms Belichtung und konstanter Photonendichte unter den Messbedingungen von (b). Daten in (c) bis (g) repräsentieren $M \pm SD$. Absolute biophysikalische Werte und die Anzahl unabhängiger Messungen finden sich in Tab. A.3.

somit zu einer Rotverschiebung der Proteinabsorption führt [Mogi et al., 1988, Subramaniam et al., 1990], sind in Chrimson die Aktionsspektren von Ci1- und Ci2-Mutanten (E165 (Ci1) und D295 (Ci2)) blauverschoben (Abb. 4.11 e und f). Die Blauverschiebung ist dabei für Mutanten des Ci2 (D295) deutlich größer als für Mutanten des Ci1 (E165) und hängt für Ci1-Mutanten wesentlich von der eingefügten Seitengruppe ab. Entsprechend ist das Aktionsmaximum der neutralen Substitution E165Q stark ($\lambda_{max} = 543$ nm) und das der E165T-Mutante kaum blauverschoben ($\lambda_{max} = 580$ nm) (Abb. 4.11 e und Tab. A.3). Im Gegensatz dazu führen alle Mutationen des Ci2 unabhängig von Art und Größe der eingefügten Aminosäure zu einer Blauverschiebung von mehr als 40 nm sowie zu einer erhöhten und äußerst variablen UV-Sensitivität (Abb. 4.11 f und Tab. A.3). Vergleichbare Farbverschiebungen wie für die Ci2-Mutanten konnten auch für Muta-

tionen von F135 beobachtet werden, welches in direkter Nachbarschaft des Ci1 positioniert ist (Abb. 4.11 a) und von dort den Protonierungszustand des Ci1 beeinflussen könnte (Abb. 4.11 g). Entsprechend ist in den Aktionsspektren von F135A und F135H eine Schulter id der roten Flanke des Spektrums zu erkennen, die auf einen weiteren absorbierenden Zustand hindeutet (Abb. 4.11 g). Die Rotlichtsensitivität wird durch eine aromatische Aminosäure an der Position von F135 begünstigt und bleibt entsprechend in F135Y hoch, wohingegen sie in F135A stark sowie in F135K vollständig reduziert ist. Somit könnten sowohl F135 als auch D295 (Ci2) den pK_a von E165 (Ci1) anheben, welches im WT entsprechend der geringen Farbverschiebung der E165T-Mutante bereits bei neutralem pH-Wert protoniert vorliegt, jedoch in Mutanten von F135 und D295 (Ci2) deprotoniert zu sein scheint, so dass die Proteinabsorption in diesen Mutanten blauverschoben wird. Alle Gegenionmutanten führen außerdem zu einer starken Reduktion der Photostromdichte (Abb. 4.11 c) und beide Gegenioncarbonsäuren scheinen für eine effiziente Kanalöffnung und Protonenleitung von Bedeutung zu sein. Gleichzeitig führen alle Mutationen von Ci2 genau wie F135K zu einer Verlangsamung des Kanalschließens. In Mutanten des Ci1 ist dagegen der Photostromrückgang beschleunigt (Abb. 4.11 d) - genau wie in den ChETA-Mutanten von *CrChR2* [Gunaydin et al., 2010].

4.2.7 Die ionenleitende Pore von Chrimson

Die ionenleitende Pore kann auch in Chrimson zwischen Helix 1, 2, 3 und 7 vermutet werden. Wichtige Aminosäuren sind hier im Vergleich zu C1C2 und *CrChR2* ausgetauscht (Abb. 4.12 a). In der äußeren Pore befinden sich an den Positionen von V156 und K132 aus C1C2 die beiden aromatischen Aminosäuren Y159 und F135 (siehe auch Abb. A.5) - wobei letztere bereits im Kontext des Gegenions im vorigen Abschnitt beschrieben wurde. Im Zentralen Tor sind S102 und N297 aus C1C2 ersetzt durch A105 und E300 in Chrimson und im Inneren Tor ist H173 durch K176 ausgetauscht. Sowohl in C1C2 und Chrimson als auch in BR konserviert findet sich weiterhin im Inneren Tor R310 und in der äußeren Pore R162. Die geladenen Seitengruppe von R162, welches als R82 in BR die extrazelluläre Protonenabgabe fördert [Luecke et al., 1998], ist in Chrimson bereits im Dunkelzustand auswärtsorientiert und scheint - sowohl direkt als auch indirekt über ein fixiertes Wasser - mit den zur Protonen-Abgabe-Gruppe aus BR homologen Seitengruppen N287 und E277 zu interagieren.

Die Bedeutung substituierter Aminosäuren im Inneren Tor, Zentralen Tor und der äußeren Pore wurde durch Mutation dieser Reste zu ihrem Gegenpart in C1C2 getestet (Abb. 4.12 b). Die Photostromdichte wird insbesondere durch Mutationen der äußeren Pore reduziert (Abb. 4.12 c), welche für eine effiziente Ionenleitung essentiell zu sein scheint. Mutationen im Inneren Tor beschleunigen die Schließkinetik des Kanals, wohingegen Mutanten der äußeren Pore und vor allem des Zentralen Tores diese verlangsamen (Abb. 4.12 d).

Im Inneren Tor konnten dabei die schnellsten Photostromkinetiken für die Mutanten K176A und R310A nach vollständiger Entfernung der positiv geladenen Seitengruppe gemessen werden. Auch die Repositionierung der positiven Seitengruppenladung in der konservativen Mutante K176R beschleunigte die Schließkinetik und findet als ChrimsonR optogenetisch Anwendung [Klapoetke

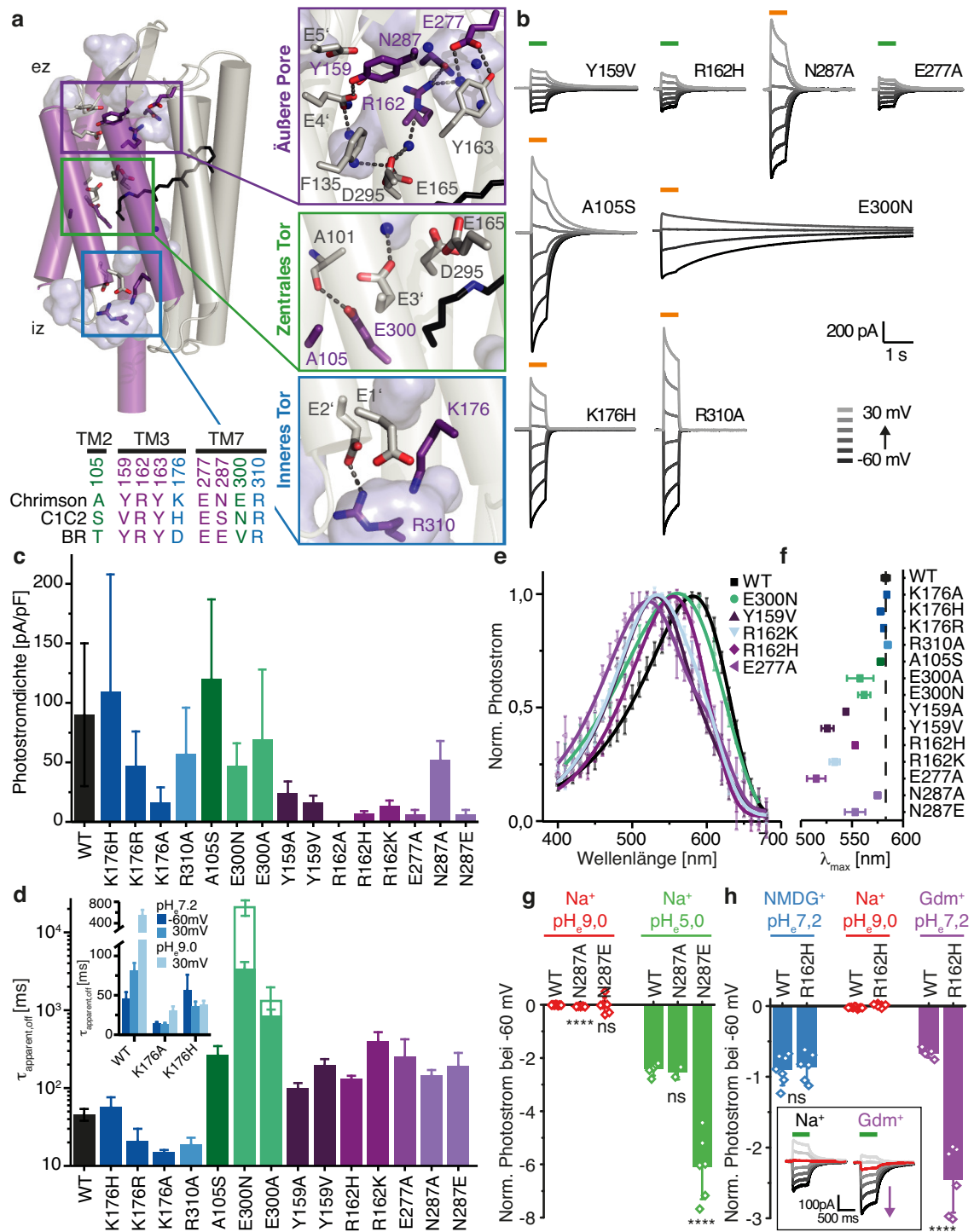


Abbildung 4.12: Chrimson-Mutanten der Pore (a) Vermutete Chrimson-Pore in der C1Chrimson-Dunkelstruktur (PDB: 5zih) [Oda et al., 2018] (links oben) und Sequenzvergleich mit C1C2 und BR (links unten) - Vergrößerungen der Äußeren Pore, des Zentralen Tores sowie des Inneren Tores (rechts). (b) Photoströme von Chrimson-Mutanten in 110 mM Na⁺ und pH_{i,e} 7,2 bei 530 nm (dunkel-grün) oder 580 nm (orange). (c) Photoströmdichten in HEK293 unter Messbedingungen aus (b). (d) τ_{app} bei -60 mV aus (b). Offene Säulen repräsentieren die Schließkinetik am Umkehrpotential, gemessen mit 20 ms -60 mV Spannungspulsen bei 0,5 Hz zur Vermeidung intrazellulärer pH_i-Änderungen. **Einschub:** Spannungs- und pH_e-Abhängigkeit der Schließkinetik von K176-Mutanten bei pH_e 7,2 und pH_e 9,0 sowie -60 mV und 30 mV (pH_i 7,2). (e) Aktionspektren bei -60 mV und Pufferbedingungen wie (b). (f) Wellenlänge maximaler Photoströmaktivität. (g + h) Normalisierte Photoströmamplituden in Bezug auf (b) nach Wechsel zu extrazellulär 110 mM NMDG⁺ oder 110 mM Gdm⁺ bei pH_e 7,2 oder 110 mM Na⁺ bei pH_e 9,0 oder pH_e 5,0. **Einschub:** Photoströme von R162H mit extrazellulär 110 mM Na⁺ oder 110 mM Gdm⁺. Daten in (c-h) zeigen M ± SD. Genaue Werte und die Anzahl unabhängiger Messungen finden sich in Tab. A.3.

et al., 2014]). Interessanterweise ist für die K176A- und K176H-Mutanten auch die Spannungs- und pH_e -Abhängigkeit der Schließkinetik reduziert (Abb. 4.12 d Einschub). Entsprechend schließt die K176A-Mutante bei positiver und negativer Spannung gleichermaßen schnell und ist bezüglich des Kanalschließens auch bei pH_e 9,0 nur geringfügig langsamer als bei pH_e 7,2. Vor allem die reduzierte Bedeutung des extrazellulären pH-Wertes überrascht, da K176 am intrazellulären Ende der Pore lokalisiert ist.

Im zentralen Tor führt dagegen die Mutation von E300 zu einer Verlangsamung der Schließkinetik um mehr als zwei Größenordnungen (Abb. 4.12 d). Wie bereits für die langsamen Mutanten der Retinalbindetasche beschrieben wurde (siehe Abschnitt 4.2.5), erwies sich auch für die Messung der langen Öffnungszeit von E300N und E300A die Änderung der intrazellulären H^+ -Konzentration und die daraus resultierende Abnahme des Photostroms als experimentelle Hürde. Auch für die E300 Mutanten wurden entsprechend Photostromkinetiken sowohl bei konstanter Spannung (Abb. 4.12 d, gefüllte Säulen) als auch mit kurzen Spannungspulsen gemessen (Abb. 4.12 d, offene Säulen). Wohingegen sich für die schnellere E300A-Mutante, beide Photostromkinetikmessungen nur geringfügig unterscheiden, kann für die E300N-Mutante die volle Zeitspanne des Kanalschließens nur durch kurze Spannungspulse erfasst werden. Sowohl E300A als auch E300N ersetzen eine potentiell negative geladene, protonierbare Glutaminsäure in direkter Umgebung der RSBH^+ durch eine neutrale Aminosäure, und dennoch ist der Photostromrückgang nach der Substitution mit Asparagin (E300N) deutlich langsamer als in E300A.

Interessanterweise haben mehrere Mutationen entlang der Pore auch einen großen Einfluss auf die Form und Lage des Aktionsspektrums (Abb. 4.12 e links) und verschieben die Wellenlänge maximaler Photostromaktivierung (Abb. 4.12 e rechts) erheblich. Während Mutationen im Inneren Tor keinen Einfluss auf die Farbaktivierung des Proteins haben, wird das Aktionsmaximum durch Substitution von Y159 und E277 auf der extrazellulären Seite des Proteins stark verschoben, trotz vergleichbarer Entfernung zum Retinalchromophor. In ihrem Betrag vergleichbar zu den Farbverschiebungen von F135A und D295A, könnten auch Y159V und E277A die Protonierung des Ci1 destabilisieren. Auch die Mutationen der potentiell geladenen Seitengruppen R162 und E300 in direkter Nachbarschaft des Gegenionkomplexes resultieren in einer Blauverschiebung der Proteinaktivierung. R162 zeigt dabei im Dunkelzustand in Richtung von N287 (Abb. 4.11 a). Während die Mutation N287A die Farbaktivierung von Chrimson jedoch kaum verändert, bewirkt das Einfügen einer negativen Ladung an selbiger Position in N287E eine Blauverschiebung vergleichbar zu R162H und könnte durch eine Salzbrücke zwischen der eingefügten Glutaminsäure (N287E) und R162 die Elektrostatik am Gegenionkomplex beeinflussen.

Gleichzeitig führt N287E - im Gegensatz zu N287A - zu einer deutlichen Reduktion der Photostromdichte (Abb. 4.12 c). Diese Reduktion der Photostromamplitude von N287E bei pH_e 7,2 wird teilweise aufgehoben bei pH_e 5,0, wo die Photostrome der N287E-Mutante deutlich stärker zunehmen als im WT - möglicherweise in Folge der Protonierung der eingefügten Glutaminsäure (Abb. 4.12 g). Eine Fixierung von R162 im Dunkelzustand durch eine Salzbrücke mit N287E in Helix 7 hätte somit auch einen Einfluss auf die Öffnung des Kanals und R162 könnte direkt an der Ausbildung der Pore beteiligt sein. Tatsächlich können keine Photostrome mit der Mutante R162A gemessen werden und auch für R162K und R162H sind die Photostrome klein (Abb. 4.12 c)

und die Photostromkinetik verlangsamt (Abb. 4.12 d). Bemerkenswerterweise ist außerdem für die R162H-Mutante die Guanidiniumleitfähigkeit erhöht, was ebenfalls auf eine Beteiligung von R162 an der Ionenleitung hindeutet. Entsprechend nahmen Photoströme von R162H bei einem Austausch des extrazellulären Na^+ durch Gdm^+ deutlich zu (Abb. 4.12 g) und auch das Umkehrpotential war - anders als im WT - auch bei neutralem pH_e 7,2 in Folge des Kationaustausches positiv verschoben (Abb. A.3).

Die Protonenselektivität verbleibt schließlich sowohl in R162H als auch in allen anderen bisher beschriebenen Porenmutanten hoch und Einwärtsströme sind nach Reduktion der extrazellulären H^+ Konzentration aufgrund eines wie im WT stark negativ verschobenen Umkehrpotentials fast vollständig verschwunden (Tab. A.4).

4.2.8 Helix-2-Glutaminsäuren in Chrimson

In *CrChR2* wurde die Ionenleitfähigkeit wesentlich durch Mutationen der in Chlorophyten ChRs konservierten Helix 2 Glutaminsäuren modifiziert [Sugiyama et al., 2009], wobei sich insbesondere E3' (E90 in *CrChR2* und E132 in Chrimson) für die Protonenselektivität als wichtig erwies [Eisenhauer et al., 2012, Ruffert et al., 2011]. Alle fünf Helix 2 Glutaminsäuren sind in Chrimson konserviert und wurden im folgenden einzeln durch ein Alanin ausgetauscht (Abb. 4.13 a). Die Membranexpression der Mutanten ist im Vergleich zum WT kaum verändert, variierte jedoch zwischen einzelnen Zellen stark (Abb. 4.13 b). Auch die Membranlokalisation¹ ist für E3'A, E4'A und E5'A vergleichbar zum WT und lediglich für E1'A und E2'A leicht reduziert (Abb. 4.13 c). Trotz nahezu unveränderter Expression führt die Substitution von E2' im Inneren Tor sowie von E4' und E5' in der äußeren Pore zu einer starken Reduktion der Photostromdichte (Abb. 4.13 d). Zur näheren Untersuchung der Protonenselektivität wurde die extrazelluläre Pufferlösung ausgetauscht (Abb. 4.13 e). Wie im WT führt auch für E1' und E3' die Reduktion der extrazellulären Na^+ -Konzentration nur zu einer geringen Änderungen der Photostromamplitude, wohingegen Einwärtsströme nach einer Reduktion der extrazellulären Protonenkonzentration (pH_e 9,0) nahezu vollständig verschwinden (Abb. 4.13 f). Genau das Gegenteil wird überraschenderweise für die Mutanten der extrazellulären Glutaminsäuren E4'A und E5'A beobachtet. Die Reduktion der extrazellulären Na^+ -Konzentration führt hier zu einer deutlichen Abnahme einwärtsgerichteter Photoströme und zu einer signifikanten Verschiebung des Umkehrpotentials, wohingegen die Absenkung der extrazellulären Protonenkonzentration Einwärtsströme nicht reduziert und nur eine geringe Verschiebung des Umkehrpotentials bewirkt (Abb. 4.13 g). Auch in E2'A sind der Rückgang des Einwärtsphotostroms sowie die Verschiebung des Umkehrpotentials bei einem Übergang von pH_e 7,2 zu pH_e 9,0 geringer ausgeprägt als im WT. Die Reduktion der Photostromdichte von E2'A, E4'A und E5'A geht entsprechend einher mit einer Abnahme der Protonenselektivität, wobei insbesondere für E4'A und E5'A die Ionenpräferenz bei neutralem pH-Wert vollkommen verändert ist und vorwiegend Na^+ anstelle von H^+ geleitet werden.

Interessanterweise haben Mutationen der Helix-2-Glutaminsäuren auch einen starken Einfluss auf

¹Wie in Abschnitt 3.6.2 eingeführt, beschreibt die Membranexpression die mit dem Membranmarker R18 kolokalisierte Proteinfluoreszenz, wohingegen für die Membranlokalisation der Quotient aus der Fluoreszenz in der Membran und dem Zellinneren gebildet wurde.

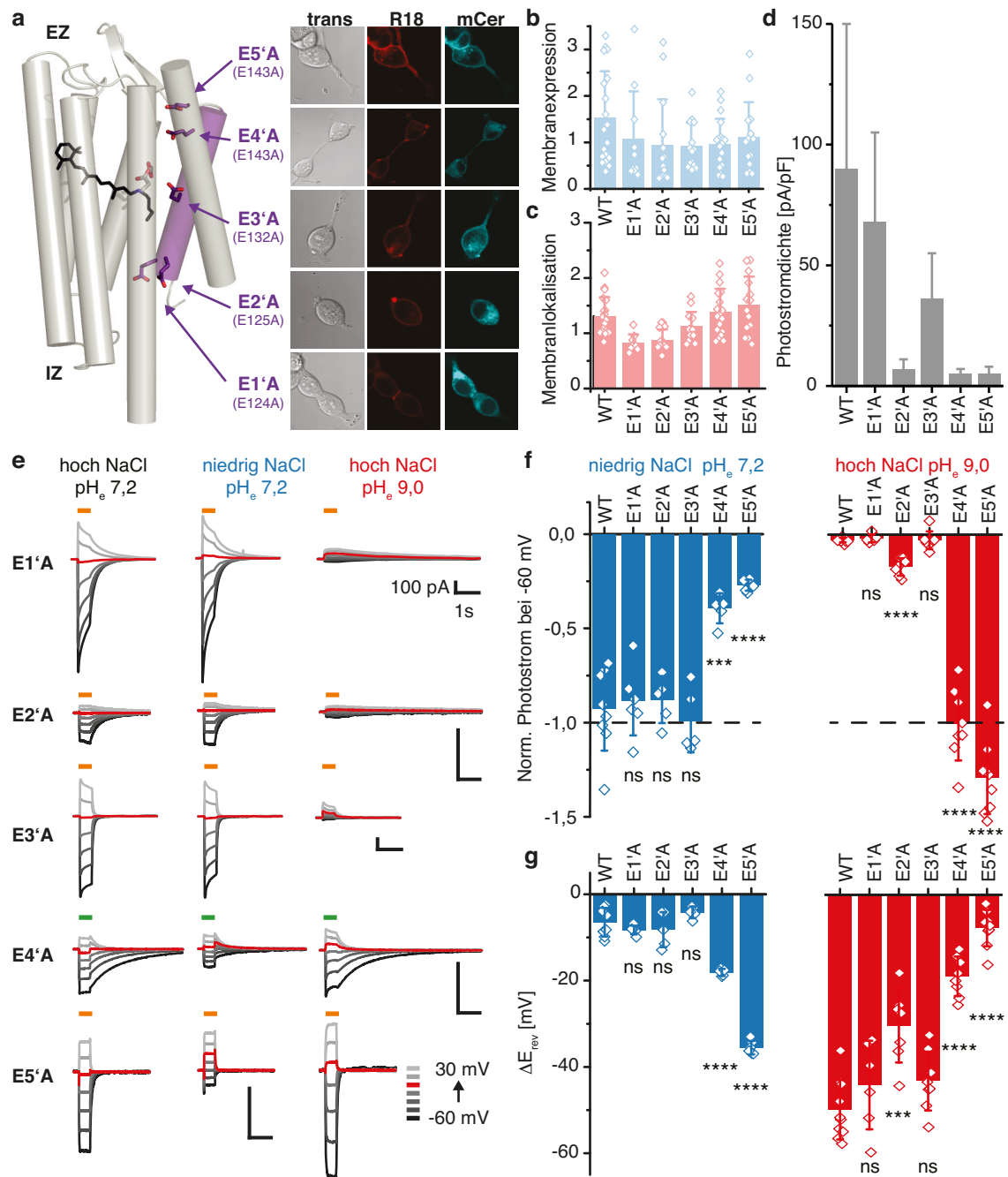


Abbildung 4.13: Einfluss von Helix-2-Glutaminsäuremutanten auf die Protonenselektivität von Chrimson (a) Links: Glutaminsäuren E1'-E5' in Helix2 (lila) in der Dunkelstruktur von C1Chrimson (5Z1H) [Oda et al., 2018]. Rechts: Konfokale-Mikroskopieaufnahmen der in HEK293 exprimierten Chrimson-Mutanten in Weißlicht (links), nach Anregung des Membranmarkers Rhodamin18 mit 559 nm (Mitte), nach Anregung des fusionierten Fluorophors mCerulean3.0 mit 440 nm (rechts) (b) mCerulean3.0 Fluoreszenz in der Membran. (c) Verhältnis der mCerulean3.0 Fluoreszenz in der Membran und im Zellinneren $F_{\text{Membran}}/F_{\text{Zytoplasma}}$. (d) Photostromdichte bei 110 mM NaCl pH_{e} 7,2 und -60 mV. (e) Repräsentative Photoströme in 110 mM NaCl pH_{e} 7,2 (links), 1 mM NaCl pH_{e} 7,2 (mitte) und 110 mM NaCl pH_{e} 9,0 mit intrazellulär 110 mM NaCl pH_{i} 7,2. (f) Normalisierte Photostromamplituden -60 mV nach Reduktion der extrazellulären Na^{+} -Konzentration (links) oder H^{+} -Konzentration (rechts) gemessen wie in (e). Die gestrichelte Linie markiert den Photostrom bei hoher und symmetrischer Na^{+} - und H^{+} -Konzentration. (g) Umkehrpotentialverschiebung nach Reduktion der extrazellulären Na^{+} -Konzentration (links) oder H^{+} -Konzentration (rechts) gemessen wie in (e). Alle Daten zeigen $M \pm \text{SD}$. Biophysikalische Größen und die Anzahl unabhängiger Messungen sind in Tab. A.3 und A.4 gegeben.

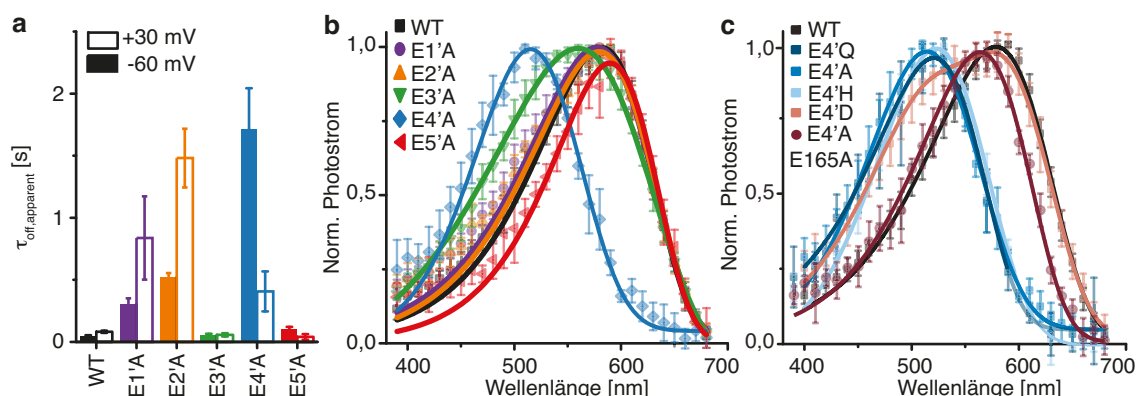


Abbildung 4.14: Kinetik und Aktionsspektrum von Helix2-Glutaminsäuremutanten von Chrimson
(a) Apparente Schließkinetik von E1'A - E5'A Mutanten bei -60 mV und 30 mV entsprechend der Messungen aus Abb. 4.13 e (110 mM NaCl pH_e 9,0) **(b)** Aktionsspektren von E1'A - E5'A nach 10 ms Belichtung und gleicher Photonendichte bei pH_e 7.2. **(c)** Aktionsspektren von E4' Mutanten nach 10 ms Belichtung verschiedener Lichtqualität und gleicher Photonendichte. Alle Daten zeigen $M \pm SD$. Biophysikalische Größen und die Anzahl unabhängiger Messungen sind in Tab. A.3 gegeben.

die Geschwindigkeit und Spannungsabhängigkeit der Photostromkinetik (Abb. 4.14 a). Die Kanalschließkinetik ist entsprechend für E1'A, E2'A und E4'A deutlich verlangsamt. Gleichzeitig ist für E4'A und E5'A die Spannungsabhängigkeit des Kanalschließens invertiert mit einer schnelleren Kinetik bei positiven als bei negativen Spannungen. In E3'A ist schließlich keine Spannungsabhängigkeit der Photostromrückgangskinetik mehr zu erkennen.

Die Mutationen E3'A und E4'A führen außerdem zu einer Blauverschiebung der Photostromaktivität (Abb. 4.14 b). Während E3'A das Aktionsspektrum verbreitert und leicht hypsochrom zu 560 nm verschiebt, ist die Farbaktivierung von E4'A um ~ 70 nm blauverschoben ungeachtet einer Entfernung von 10 \AA zur RSBH⁺. Bei genauer Betrachtung verschiedener E4'-Mutanten zeigt sich, dass bereits eine kleine Änderung der Position oder des pK_a -Wertes der Carboxylgruppe - wie zum Beispiel in E4'D - ausreichen, die Rotlichtaktivierung zu destabilisieren (Abb. 4.14 c). Das Aktionsspektrum von E4'D zeigt bereits bei neutralem pH_e 7,2 ein Gleichgewicht eines orange und eines blau absorbierenden Zustandes (580 nm und 520 nm). Trotz unterschiedlicher Seitengruppenfunktionalitäten sind die Aktionsspektren von E4'A, E4'Q und E4'H ähnlich weit blauverschoben und könnten - genau wie im vorigen Abschnitt für F135 Mutanten diskutiert - auf eine unterschiedliche Protonierung des Ci1 (E165) zurückzuführen sein, welche durch E4' bestimmt wird. Diese Hypothese kann durch das Aktionsspektrum der Doppelmutante E4'A-E165A bestätigt werden (Abb. 4.14 c), welches im Vergleich zu E4'A erneut rotverschoben ist und sich mit einem Aktionsmaximum bei 560 nm mit dem Spektrum der Gegenioneneinzelmutante E165A deckt, in welcher eine Deprotonierung des Ci1 nicht mehr möglich ist (Abb. 4.11 e). Die besondere Bedeutung von E4' für Photostromkinetik und Farbsensitivität könnte auf dessen für Chrimson spezifische Wasserstoffbrückenbindung mit Y159 zurückzuführen sein (Abb. 4.12 a), welche die porenflankierenden Helices 2 und 3 im Dunkelzustand verknüpft und als zusätzliches Äußere Tor bezeichnet werden kann.

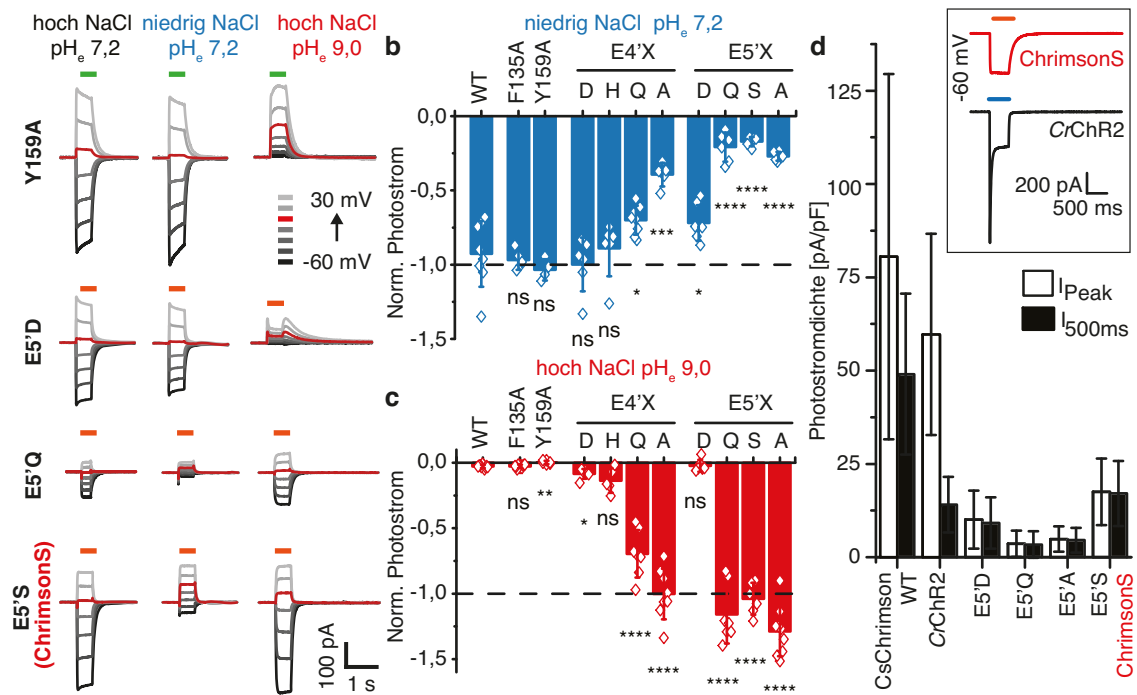


Abbildung 4.15: Molekulare Bestimmungsfaktoren der Protonenselektivität von Chrimson (a) Repräsentative Photoströme in 110 mM NaCl pH_e 7,2 (links), 1 mM NaCl pH_e 7,2 (Mitte) und 110 mM NaCl pH_e 9,0 (rechts) mit intrazellulär 110 mM NaCl pH_i 7,2. (b) Normalisierte Photostromamplituden bei -60 mV nach Reduktion der extrazellulären Na⁺-Konzentration. (c) Normalisierte Photostromamplituden nach Reduktion der extrazellulären H⁺-Konzentration. (d) Photostromdichte bei 110 mM Na⁺ pH_i 7,2 und -60 mV im Maximum-/Peakstrom (offene Balken) oder nach 500 ms Belichtung (gefüllte Balken). **Ein-schub:** Repräsentative Photoströme für (d). Alle Daten zeigen M ± SD. Biophysikalische Größen und die Anzahl unabhängiger Messungen sind in Tab. A.3 und A.4 gegeben.

4.2.9 Molekulare Bestimmungsfaktoren der Protonenselektivität von Chrimson

Die Helix-2-Glutaminsäuremutanten haben gezeigt, dass die hohe Protonenselektivität von Chrimson wesentlich durch Strukturelemente der äußeren Pore bestimmt wird. Besonders auffällig sind hier in Chrimson die Aminosäuren K132 und V156 aus C1C2 durch die raumgreifenden aromatischen Reste F135 und Y159 substituiert, welche den Ionenfluss größerer Kation blockieren und nur kleine Protonen durchlassen könnten. Besonders die Position von Y159 wurde bereits in CrChR2 (Q117 in CrChR2) bezüglich ihres Einflusses auf die Kationleitfähigkeit diskutiert [Gaiko and DempSKI, 2013] und könnten auch in Chrimson für die Ionenselektivität von Bedeutung sein. Wider Erwarten unterscheiden sich jedoch die Photoströme von F135A und Y159A trotz der kleineren Seitengruppen nicht vom WT und bleiben nach Reduktion der extrazellulären Na⁺-Konzentration nahezu unverändert groß und verschwinden nach Reduktion der extrazellulären H⁺-Konzentration wie der WT fast vollständig (Abb. 4.15 a bis c).

Unterschiedliche Substitutionen an den Positionen von E4' und E5' offenbaren dagegen eine Abhängigkeit der Protonenselektivität von der Protonierbarkeit der eingefügten Seitengruppe. Somit entsprechen die normalisierten Einwärtsströme der Mutanten E4'D, E4'H und E5'D sowohl bei niedriger extrazellulärer Na⁺-Konzentration als auch bei hohem extrazellulärem pH-Wert weiter jenen des WT, wohingegen bei einer Substitution durch die nicht weiter protonierbaren Reste

Glutamin, Alanin und Serin (E4'Q, E4'A, E5'Q, E5'A und E5'S) Photoströme bei reduzierter extrazellulärer Na^+ -Konzentration abnehmen und bei niedriger extrazellulärer Protonenkonzentration groß bleiben (Abb. 4.15 a bis c). Interessanterweise ist die Protonenselektivität vergleichbar reduziert für alle neutralen Substitutionen von E5' unabhängig von der Größe der eingefügten Seitengruppe, wohingegen für Mutanten von E4' die Protonenselektivität von E4'Q größer ist als für E4'A und zusätzlich zur Protonierbarkeit auch die Größe der eingefügten Seitengruppe von Bedeutung zu sein scheint.

Unter allen Na^+ -leitenden Chrimson-Mutanten sind die Photoströme von E5'S am größten und nach 500 ms Belichtung in ihrer Amplitude vergleichbar zu den stationären Strömen von CrChR2 (Abb. 4.15 d). Die im Vergleich zum Chrimson WT unveränderte Rotlichtaktivierung, weiterhin schnelle Photostromkinetik und 20-fach erhöhte Natriumselektivität ($P_H/P_{Na} = 5,4 \pm 0,1 \times 10^5$) empfehlen Chrimson E5'S - welches wir ChrimsonS(odium) nennen - als ein exzellentes optogenetisches Werkzeug zur Depolarisation elektrisch aktiver Zellen.

4.2.10 pH-Abhängigkeit des Photozyklus von Chrimson

Zur Komplementierung elektrophysiologischer Messungen wurde das CsChrimson-Protein in der Hefe *Pichia pastoris* exprimiert, mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt und die Proteinabsorption bei verschiedenen pH-Werten gemessen. In Abhängigkeit des pH-Wertes ändert sich die Farbe des solubilisierten Proteins von lila zu pink (Abb. 4.16 a Einschub). Die Absorptionsmaxima des aufgereinigten Proteins sind mit $\lambda_{max}(\text{pH } 5,0) \sim 580 \text{ nm}$ und $\lambda_{max}(\text{pH } 9,0) \sim 520 \text{ nm}$ (Abb. 4.16 a)) überraschenderweise weiter separiert als die Maxima der entsprechenden Aktionsspektren ($587 \pm 1 \text{ nm}$ bei pH 5,0 und $556 \pm 3 \text{ nm}$ bei pH 9,0 Abb. 4.7 d). Außerdem sind Änderungen der Proteinabsorption (bei 600 nm) mit einem pK_a von 6,5 nahezu über den gesamten gemessenen pH-Bereich zu beobachten (Abb. 4.16 a Einschub), wohingegen sich die Aktionsspektren zwischen pH_e 5,0 und pH_e 7,2 kaum unterscheiden (Abb. 4.7 d).

Photoströme in HEK293-Zellen und Absorptionsänderungen des aufgereinigten Proteins können durch einen ns-Laserblitz ausgelöst werden und erlauben die Betrachtung einer synchron aktivierten Population von Kanälen während eines einzelnen Photozyklusdurchlaufs (Abb. 4.16 b). Zeitaufgelöste Absorptionsänderungen wurden in Kooperation mit Dr. Benjamin S. Krause wie in dessen Dissertationsschrift „Spektroskopische Charakterisierung der grün-absorbierenden Kanalrhodopsin-Chimäre ReaChR“ [Krause, 2018] beschrieben gemessen.

Bemerkenswerterweise unterscheiden sich sowohl die Photostromkinetik als auch Absorptionsänderungen je nach pH-Wert und Anregungswellenlänge (Abb. 4.16 b+c). Bei $\text{pH}_{i/e}$ 5,0 steigt der Chrimsonphotostrom monoexponentiell mit einem τ_{on} von $0,21 \pm 0,02 \text{ ms}$ nach Anregung mit 520 nm und $0,4 \pm 0,1 \text{ ms}$ nach Anregung mit 580 nm und geht anschließend unabhängig von der Anregungswellenlänge biexponentiell mit Zeitkonstanten von 20 ms und 80 ms zurück (Abb. 4.16 b und d). Aufgrund der langsameren Öffnungskinetik erreichen die Photoströme bei Anregung mit 580 nm-Licht 1,5 ms später ihre maximale Amplitude als bei 520 nm-Anregung. Zeitlich korreliert der Photostrom bei pH 5,0 sowohl in seiner Entstehung als auch seinem Zerfall mit der transienten Absorptionszunahme bei 490 nm in den Blitzlichtphotolysemessungen. Das

P_{490} -Intermediat stellt hierbei einen äußerst ungewöhnlichen blauverschobenen leitenden Zustand dar, der ohne detektierbare Deprotonierung der $RSBH^+$ gebildet zu werden scheint und für andere ChRs bisher nicht beobachtet wurde.

Bei $pH_{i/e}$ 8,0 erfolgt sowohl das Kanalöffnen als auch das Kanalschließen biexponentiell (Abb. 4.16 c und d). Die Porenöffnung wird eingeleitet durch einen kurzen Auswärtsstrom 100 μ s nach Laser-

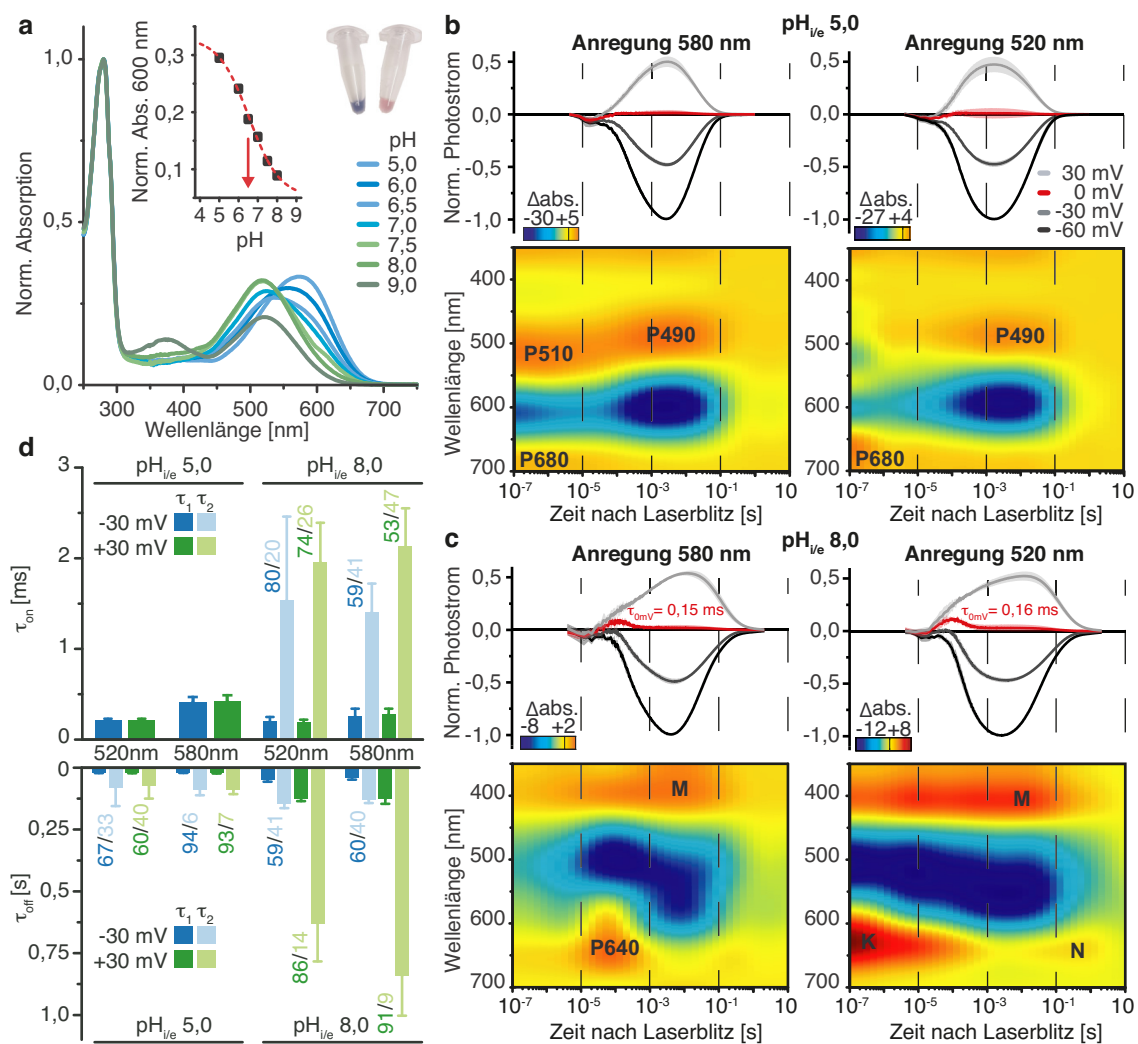


Abbildung 4.16: Zeitliche Entwicklung des Chrimsonphotostroms (a) Normalisierte Proteinabsorption von CsChrimson in 100 mM NaCl bei verschiedenen pH-Werten. Einschub: Proteinabsorption bei 600 nm und aufgereinigte Proteinproben bei pH 8,0 (links) und pH 5,0 (rechts). (b) Normalisierte, gemittelte Photoströme (oben) und Proteinabsorptionsänderung (in mOD, unten) nach Anregung mit einem Nanosekundenlaserpuls von 580 nm (links) und 520 nm (rechts) bei $pH_{i,e}$ 5,0 ($M \pm SD$, $n=4$). (c) Wie (b) bei $pH_{i,e}$ 8,0 ($M \pm SD$, $n=5-6$). (d) Zeitkonstanten der Kanalöffnung (oben) sowie des Kanalschließens (unten) entsprechend der Messungen in (b) und (c). Zur Bestimmung der Kanalöffnungskinetik wurden ausschließlich auf Ladungsverschiebungen zurückzuführende Photoströme am Umkehrpotential bei 0 mV von den Kanalströmen bei 30 mV und -30 mV subtrahiert und die korrigierten Photoströme exponentiell angenähert. Gezeigt sind $M \pm SD$ sowie der Amplitudenanteil der dargestellten Zeitkonstanten als Zahl über den Säulen. Zeitliche Absorptionsänderungen in (b unten) und (c unten) wurden gemessen, ausgewertet und bereitgestellt von Dr. Benjamin S. Krause und sind in ähnlicher Form bereits in dessen Dissertationsschrift publiziert [Krause, 2018].

anregung, welcher zeitlich mit der Zunahme der Proteinabsorption bei 400 nm und entsprechend wahrscheinlich der Deprotonierung der RSBH⁺ korreliert. Die beiden Zeitkonstanten der Kanalöffnung bei pH 8,0 unterscheiden sich voneinander deutlich. Das $\tau_{on,1}$ ähnelt der bei pH 5,0 monoexponentiell angeglichenen Kinetik und ist genau wie diese abhängig von der Anregungswellenlänge. Das $\tau_{on,2}$ ist dagegen unabhängig von der Anregungswellenlänge, dafür jedoch spannungsabhängig mit Werten von 0,6 - 2,2 ms. Bei pH 8,0 korrelieren die Photoströme zeitlich mit der Zunahme der Absorption bei 400 nm und bleiben bis in den späten N-ähnlichen Zustand mit einer maximalen Absorptionsänderung bei 630 nm erhalten. In Anlehnung an die Photointermediate aus BR kommen somit sowohl der M-Zustand als auch der N/O-Zustand als potentiell leitende Zustände des bei alkalischen pH-Wert vorliegenden grünlichtabsorbierenden Dunkelzustandes von Chrimson in Frage. Die biphasische Öffnungskinetik des Kanals erlaubt hierbei zwei Interpretationen. Entweder Chrimson besitzt bei alkalischem pH-Wert zwei Offenzustände unterschiedlicher Leitfähigkeit oder Chrimson liegt bei pH_e 8,0 in einem heterogenen Dunkelzustandsgemisch vor, in welchem aufgrund von Abweichungen der pK_a -Werte in Detergens und der Zellmembran der rotverschobene Dunkelzustand sauren pH-Wertes sowie der blauverschobene Dunkelzustand alkalischen pH-Wertes gleichzeitig vorliegen. Insbesondere die Übereinstimmung der schnellen Zeitkonstanten des Photostroms bei pH 8,0 mit den Zeitkonstanten bei pH 5,0 sowie das selbst bei pH 9,0 im Vergleich zur Proteinabsorption weiterhin rotverschobene Aktionsspektrum (Abb. 4.7 d) deuten darauf hin, dass auch bei pH 8,0 der rote Dunkelzustand saurer pH-Werte weiterhin vorliegt und nach Lichtabsorption auch dessen leitender P490 Zustand gebildet wird.

Überraschenderweise können darüber hinaus je nach Anregungswellenlänge unterschiedliche transiente Absorptionsänderungen vor der Öffnung des Kanals beobachtet werden (Abb. 4.16 b und c). Bei Anregung des sauren Dunkelzustandes bei pH 5,0 mit 580 nm kommt es zu einer frühen Absorptionzunahme bei 510 nm, welche nicht nach Anregung mit 520 nm zu beobachten ist. Auch bei pH 8,0 tritt ein frühes rotverschobenes K-Intermediat ausschließlich nach Anregung mit grünem Licht, aber nicht nach oranger Belichtung auf.

4.2.11 Lichtadaptation von Chrimson

Im Gegensatz zu *CrChR2* inaktivieren die Photoströme des dunkeladaptierten Chrimson unter 500 ms Belichtung kaum (Abb. 4.17 a). Der in vielen Zellen zu beobachtende langsame Photostromrückgang variiert je nach Photostromamplitude und konnte in Abschnitt 4.1.2 auf eine Änderung des elektrochemischen Gradienten aufgrund einer intrazellulären Ansäuerung zurückgeführt werden. Ein transienter Photostrom bei 600 nm-Anregung kann dennoch auch für Chrimson beobachtet werden, jedoch nicht nach längeren Dunkelperioden wie in *CrChR2* [Nagel et al., 2003], sondern in Folge unterschiedliche Vorbelichtung. Die Vorbelichtung mit 410 nm Licht führt hierbei zu einer Zunahme des transienten Photostroms um $25 \pm 8\%$, wohingegen die Vorbelichtung mit 690 nm in einer Abnahme um $10 \pm 4\%$ resultiert (Abb. 4.17 a Einschub). Der je nach Vorbelichtung angepasste initiale Photostrom fällt oder steigt anschließend innerhalb von Millisekunden auf das Photostromniveau des ausschließlich mit 600 nm belichteten Proteins.

Auch für die langsame *CrChR2*-Mutante C128T wurden unterschiedliche Dunkelzustände je nach

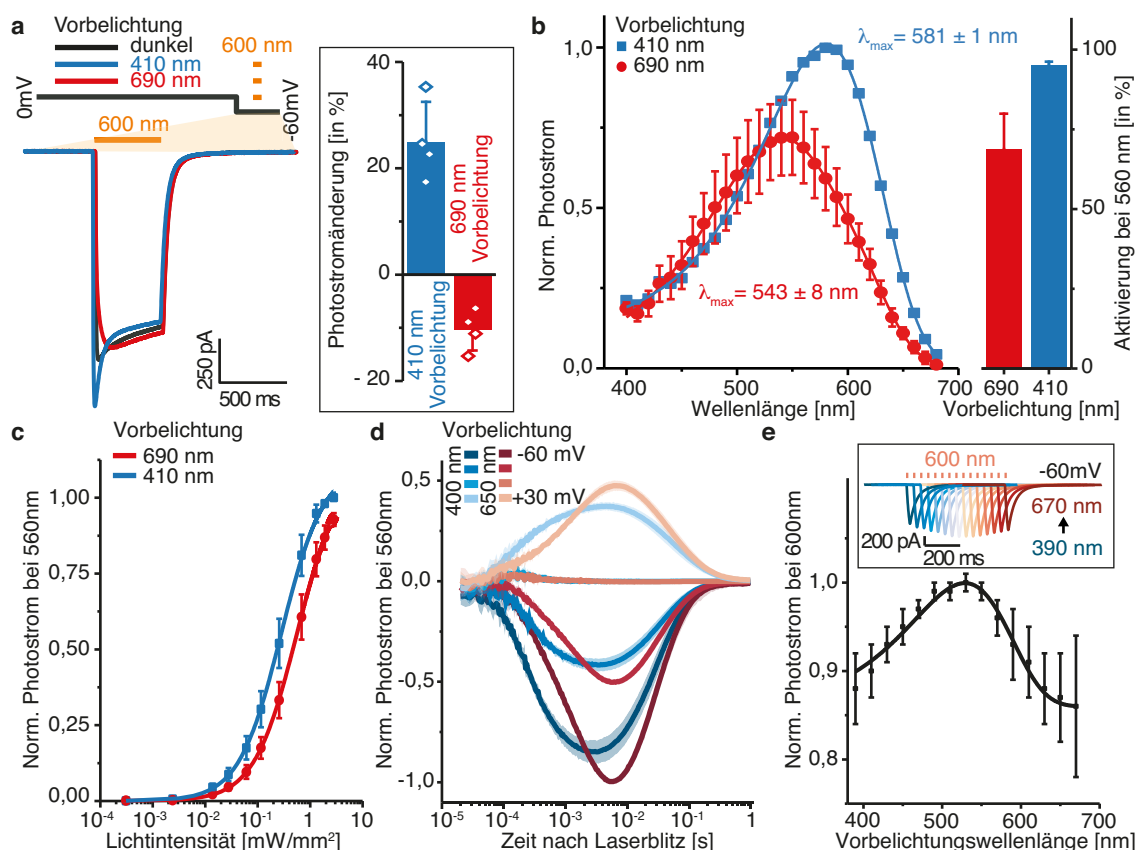


Abbildung 4.17: Lichtadaptation von Chrimson (a) Repräsentative Photoströme von Chrimson bei 500 ms Belichtung mit 600 nm und -60 mV nach 5 s-Vorbelichtung mit violetter (410 nm) oder rotem (690 nm) Licht. Das Dunkelintervall zwischen Vorbelichtung und elektrischer Messung betrug 10 s. Einschub: Photostromzunahme oder -abnahme nach unterschiedlicher Vorbelichtung verglichen zum nicht vorbelichteten Protein (dunkel). (b) Links: Aktionsspektren bei 10 ms Anregung und -60 mV nach 1 s-Vorbelichtung mit 410 nm oder 690 nm. Rechts: Photostromamplitude bei Aktivierung mit 560 nm nach verschiedener Vorbelichtung, normalisiert auf den maximalen Photostrom ($n=7-8$). (c) Normalisierter Photostrom bei 20 ms Anregung und -60 mV sowie steigender Lichtintensität nach 5 s Vorbelichtung mit 410 nm oder 690 nm ($n=7$). (d) Normalisierte Photoströme nach Anregung mit einem 7 ns-Laserpuls nach 10 s-Vorbelichtung ($n=11-12$). (e) Photoströme nach 20 ms Anregung mit 600 nm (Einschub) und normalisierte Amplituden nach 10 s-Vorbelichtung mit Licht verschiedener Wellenlänge, jedoch gleicher Photonendichte ($n=5$). Alle dargestellten Messungen zeigen $M \pm SD$. Der extrazelluläre Puffer enthielt 110 mM NaCl und pH_e 7,2. Der intrazelluläre Puffer enthält für (a), (b), (c) und (e) 55 mM NaCl, 100 mM HEPES und pH_i 7,2 und für (d) 110 mM NaCl, 10 mM HEPES sowie durchgehend $pH_{i,e}$ 7,2. Alle Vorbelichtungen wurden bei 0 mV und 10 s vor der Photostrommessung durchgeführt.

Vorbelichtung spektroskopisch beobachtet und verschiedenen Retinalisomerisierungen zugeordnet [Ritter et al., 2013]. In der Annahme, dass auch für Chrimson je nach Belichtungsfarbe unterschiedliche Dunkelzustände populiert werden und sich wie in BR spektral unterscheiden, wurden Aktionsspektren nach blauer und roter Vorbelichtung gemessen (Abb. 4.17 b links). Und tatsächlich unterscheiden sich die Aktionsspektren nach roter Vorbelichtung ($\lambda_{max} = 543 \pm 8$ nm) und blauer Vorbelichtung ($\lambda_{max} = 580,5 \pm 1,2$ nm) erheblich und deuten auf eine ausgeprägte Dunkelzustandsheterogenität von Chrimson hin. Bei 560 nm werden beide Dunkelzustände gleichermaßen zu 95% aktiviert. Trotzdem sind die Photoströme des rot vorbelichteten Dunkelzustandes

kleiner und erreichen bei 560 nm nur $73 \pm 18\%$ der Größe der Photoströme des blau vorbelichteten Dunkelzustandes (Abb. 4.17 b rechts). Neben der Absorptionswellenlänge und der Photostromamplitude unterscheidet sich auch die Lichtsensitivität und Kanalöffnungskinetik beider Dunkelzustände (Abb. 4.17 c und d). Der rot vorbelichtete Dunkelzustand ist aufgrund eines vermutlich kleineren Absorptionsquerschnittes weniger lichtsensitiv und öffnet langsamer als der blau vorbelichtete Dunkelzustand und trägt aufgrund der geringeren Photostromamplitude bei gleichzeitiger Aktivierung beider Dunkelzustände weniger zum Gesamtphotostrom bei neutralem pH_e -Wert bei. Betrachtet man schließlich den Photostrom bei kurzer 600 nm Anregung und variiert die Vorbelichtungswellenlänge, so kann das Vorbelichtungsspektrum des Dunkelzustandsüberganges bestimmt werden (Abb. 4.17 e). Maximale Photoströme bei 600 nm - und die somit größtmögliche Akkumulation des rotverschobenen Dunkelzustandes - wurden nach einer Vorbelichtung mit 522 ± 5 nm erzielt.

Bei aufmerksamer elektrophysiologischer Betrachtung des Photostroms unmittelbar nach Belichtung mit 530 nm und 600 nm lässt sich ein unvollständiges Kanalschließen nach Grünlichtaktivierung erkennen (Abb. 4.18 a). Insbesondere bei $\text{pH}_{i/e}$ 8,0 ist der Kanal auch 5 s nach Aktivierung mit 530 nm weiterhin zu $3,0 \pm 0,5\%$ (des maximalen Photostroms) geöffnet und kein weiterer Photostromrückgang ist erkennbar. Der Dunkelstrom nach Grünlichtaktivierung lässt sich eindeutig von einer Grundlinienverschiebung unterscheiden, da nach weiterer 2 s Belichtung mit UV-Licht von 400 nm ein vollständiger Rückgang des Photostroms zu beobachten ist. Sowohl bei pH 5,0 als auch bei 600 nm Anregung ist der Dunkelstrom dagegen reduziert ($0,6 \pm 0,4\%$ bei 530 nm $\text{pH}_{i,e}$ 5,0, $0,6 \pm 0,5\%$ bei 600 nm $\text{pH}_{i,e}$ 5,0, $0,2 \pm 0,1\%$ bei 600 nm $\text{pH}_{i,e}$ 7,2, $0,5 \pm 0,3\%$ bei 600 nm $\text{pH}_{i,e}$ 8,0) (Abb. 4.18 b). Auch die Dauer der grünen Belichtung fördert den Dunkelstrom (Abb. 4.18 c).

Ein deutlich größerer relativer Dunkelstrom ist für Mutanten des Gegenions (E165A/Q/T), Mutanten des Äußeren Tores (Y159A/V) sowie Mutationen in direkter Umgebung des Gegenionkomplexes (S169A in Helix 3 und C294A/L in Helix 7) zu beobachten (Abb. 4.18 d). Mutationen des Ci1 erhöhen hierbei auch den Dunkelstrom nach Rotlichtaktivierung, so dass für E165A und E165Q kein Unterschied der Dunkelströme nach Rot- oder Grünlichtaktivierung mehr festzustellen ist. Auch in ihrer Größe unterscheiden sich die Dunkelströme der Ci1 Mutanten und unterstreichen die Bedeutung von Ci1 als Schlüsselposition für ein vollständiges Kanalschließen. Weitere Mutationen in der äußeren Pore wie N287A oder in der Retinalbindetasche wie Y220F haben dagegen nur einen geringen Einfluss auf den Dunkelstrom. Die Mutante C294L zwischen Ci2 und RSBH⁺ verstärkt den Dunkelstrom bei nahezu gleichem Aktionsspektrum des WT (Tab. A.3). Für den WT und C294L konnte abschließend ein Aktionsspektrum des Dunkelstroms gemessen werden und offenbart minimale Dunkelströme in Folge der Aktivierung mit UV- und Rotlicht sowie maximale Dunkelströme nach Aktivierung mit 529 ± 7 nm und 532 ± 4 nm Licht (Abb. 4.18 e).

4.2.12 Zeitliche Entwicklung des Photostroms der Chrimson-E4'A-Mutante

Von herausragender Bedeutung für die Rotlichtaktivierung, Protonenselektivität und Photostromkinetik von Chrimson ist die Glutaminsäure E4'/E139 im Äußeren Tor. Genau wie das Akti-

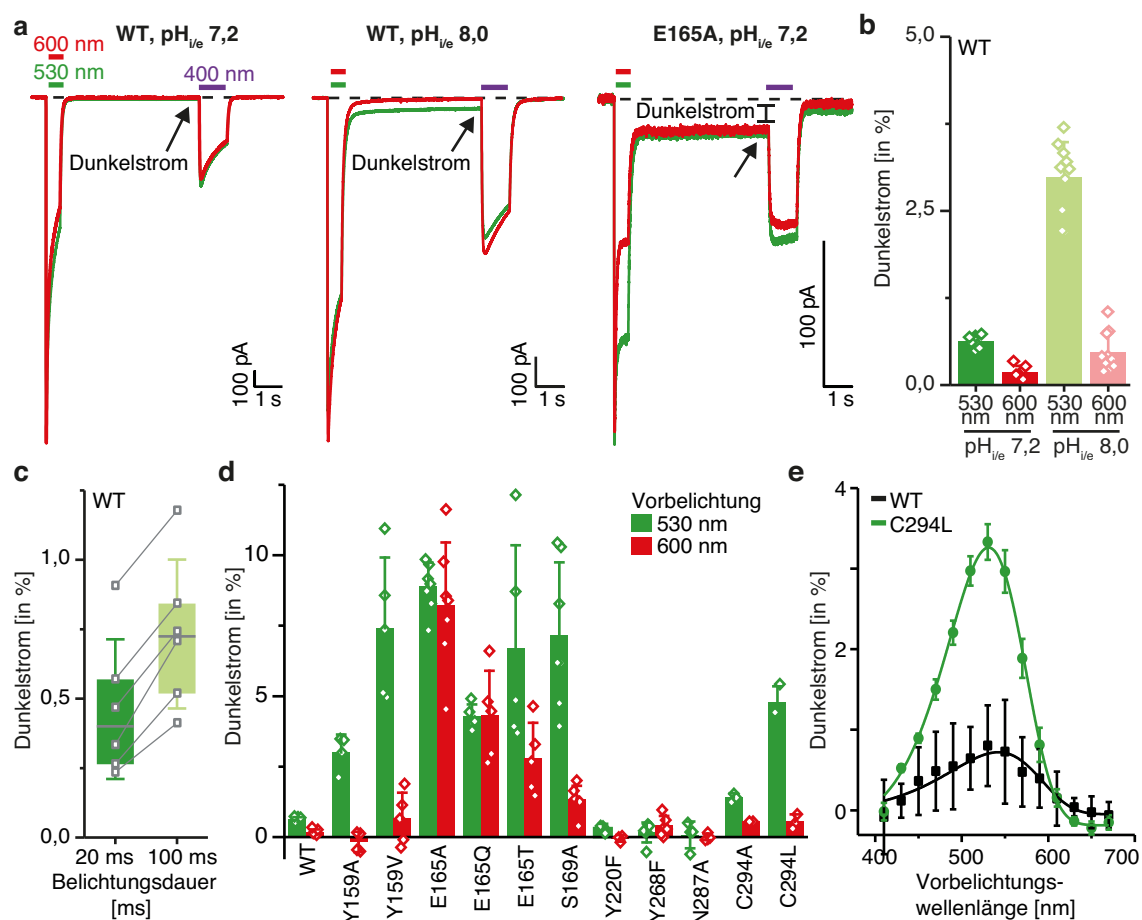


Abbildung 4.18: UV-sensitiver Dunkelstrom von Chrimson (a) Repräsentative Messungen des UV-sensitiven Dunkelstroms mit CsChrimson WT und E165A bei 110 mM NaCl und $\text{pH}_{i,e}$ 7,2 oder $\text{pH}_{i,e}$ 8,0. Mit 400 nm vorbelichtete Zellen wurden für 0,5 s mit rotem oder grünem Licht bei -60 mV aktiviert und der Dunkelstrom 5 s nach Belichtung gemessen. Anschließend konnte durch erneute Belichtung mit 400 nm für 1 s ein vollständiges Schließen des Kanals erreicht werden. (b) Normalisierte Dunkelströme des WT nach unterschiedlicher Vorbelichtung entsprechend (a). (c) Normalisierter Dunkelstrom des WT bei $\text{pH}_{i,e}$ 7,2 und -60 mV nach Belichtung mit 530 nm für 10 ms oder 100 ms. (d) Normalisierte Dunkelströme von WT und Mutanten bei $\text{pH}_{i,e}$ 7,2 entsprechend (a). (e) Dunkelstrom bei $\text{pH}_{i,e}$ 7,2 und -60 mV in Folge einer 0,5 s Vorbelichtung mit unterschiedlicher Wellenlänge aber gleicher Photonendichte für WT und C294L-Mutante ($n=3-7$). Alle Daten zeigen $M \pm \text{SD}$.

onsspektrum, ist auch das Absorptionsspektrum des aufgereinigten CsChrimson-E4'A-Proteins im Vergleich zum WT um mehr als 50 nm zu 525 nm blauverschoben (Abb. 4.19 a). Trotz einer Schulter bei 600 nm ist keine pH-abhängige Absorptionsänderung wie beim WT zu beobachten und in Übereinstimmung mit den gemessenen Aktionsspektren der E4'-Mutanten (Abb. 4.11 e) scheint das Ci1 bei allen pH-Werten deprotoniert zu sein. Nichtsdestotrotz unterscheiden sich auch für E4'A die zeitlichen Absorptionsänderungen nach Aktivierung mit einem Nanosekundenlaser bei verschiedenen pH-Werten deutlich (Abb. 4.19 b unten). Bei pH 8,0 ist für E4'A wie auch im WT (Abb. 4.16 c rechts) ein früher K-ähnlicher Zustand und anschließend ein langlebiger M-ähnlicher und N-ähnlicher Zustand zu erkennen. Sowohl der M- als auch der N-ähnliche Zustand korrelieren zeitlich mit den bei gleichem pH-Wert gemessenen Photoströmen und könnten auch hier leitende Zustände darstellen (Abb. 4.19 b oben). Gleichzeitig kann auch für E4'A bei

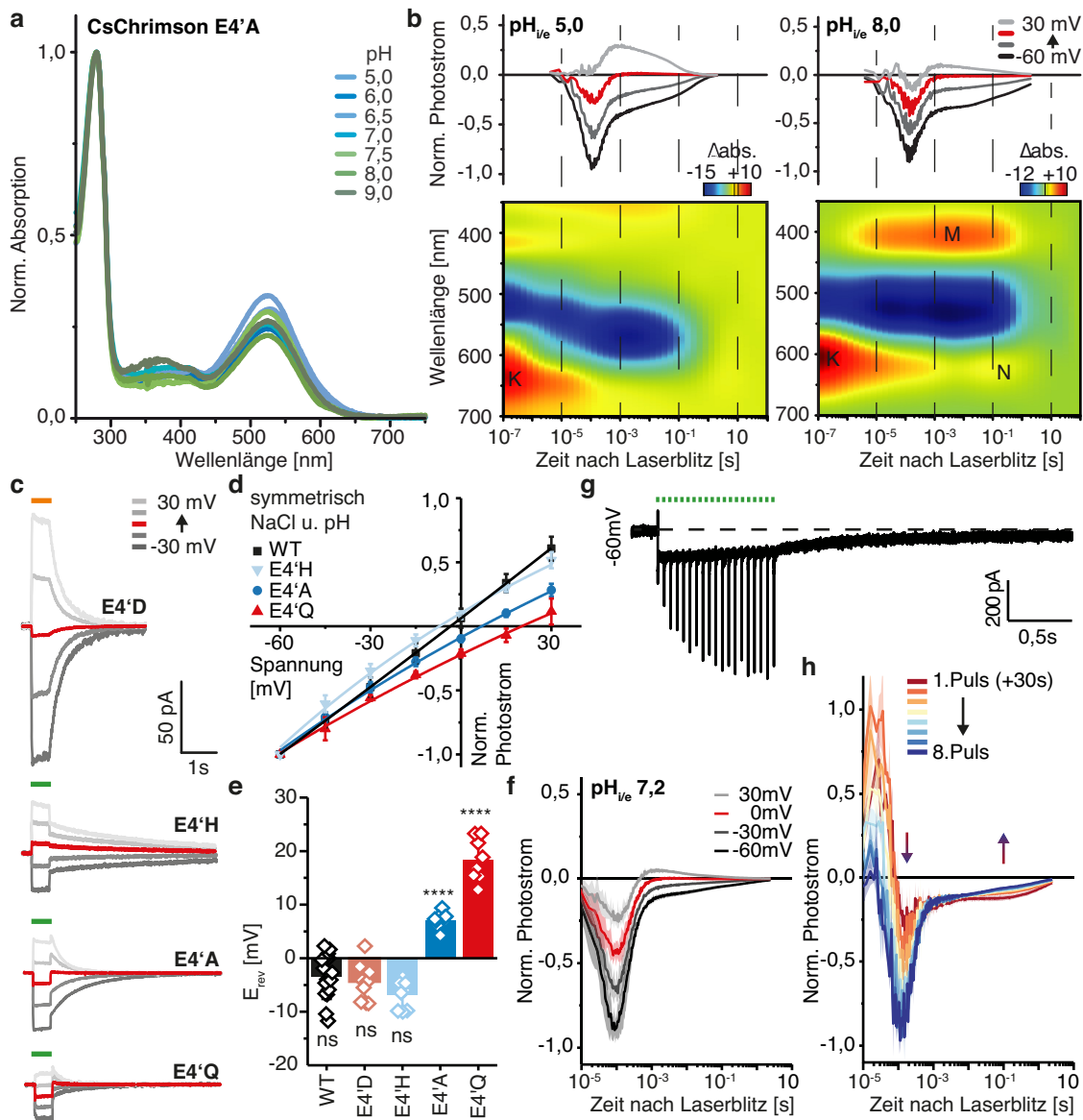


Abbildung 4.19: Zeitliche Entwicklung des Photostroms und einwärtsgerichteter Protonentransport von Chrimson E4'-Mutanten (a) Normalisierte Proteinabsorption von CsChrimson E4'A in 100 mM NaCl bei verschiedenen pH-Werten. (b) Normalisierter Photostrom (oben) sowie Proteinabsorptionsänderung (in mOD, unten) nach Anregung von CsChrimson E4'A mit einem 7/10-ns-Laserpuls von 520 nm bei $pH_{i,e}$ 5,0 (links) und bei $pH_{i,e}$ 8,0 (rechts). (c) Repräsentative Photoströme von CsChrimson E4'-Mutanten in symmetrisch 110 mM Na^+ und $pH_{i,e}$ 7,2 angeregt mit 580 nm (oranger Balken) und 530 nm Licht (grüner Balken). (d) Normalisierte Photoströme bei unterschiedlichen Haltespannungen unter den Bedingungen aus (c) ($n=8-15$). (e) Absolute Umkehrpotentiale entsprechend (c) und (d). (f) Normalisierter, gemittelter Photostrom von CsChrimson-E4'A nach Anregung mit einem 520 nm-Nanosekundenlaserpuls bei $pH_{i,e}$ 7,2 ($n=5$). (g) Repräsentativer Photostrom von Chrimson E4'A bei -60 mV und Anregung mit 520 nm-Nanosekundenlaserpulsen in einer Frequenz von 20 Hz bei $pH_{i,e}$ 7,2 (h) Repräsentative Photoströme von CsChrimson E4'A bei -60 mV und $pH_{i,e}$ 7,2 sowie wiederholter Anregung mit 520 nm-Laserpulsen in einem Abstand von 30 s. Pfeile bei 0,3 ms und 100 ms indizieren Photostromzunahme und -abnahme im jeweiligen Zeitbereich. Daten in (d), (e) und (f) repräsentieren $M \pm SD$. Zeitliche Absorptionsänderungen in (b) wurden gemessen, ausgewertet und bereitgestellt von Dr. Benjamin S. Krause.

pH 5,0 keine Deprotonierung der RSBH⁺ beobachtet werden (Abb. 4.16 b links). Obwohl auch keine Absorptionszunahme bei 490 nm zu beobachten ist, kann der leitende Zustand als Ursache der Verschiebung der Grundzustandsbleichung erahnt werden.

Anders als der WT zeigt E4'A 100 μ s nach Anregung einen transienten einwärtsgerichteten Photostrom, welcher bei pH 5,0 und pH 8,0 mit dem Abklingen des K-Zustandes und der Ausbildung des vermeintlich leitenden Zustandes korreliert (Abb. 4.19 b oben). Unter längerer Belichtung scheint dieser transiente Photostrom zu einem aktiven Ladungstransport in die Zelle zu führen. Somit wurde auch bei symmetrischen Na⁺- und H⁺-Konzentrationen unter Dauerlicht ein einwärtsgerichteter Photostrom ohne anliegenden elektrochemischen Gradienten gemessen (Abb. 4.19 c), welcher in E4'A und sogar noch deutlicher in E4'Q zu einer signifikanten Verschiebung des Umkehrpotentials führt (Abb. 4.19 d und e). Insbesondere die signifikante Abweichung des Umkehrpotentials von dem unter symmetrischen Ionenbedingungen für einen passiven Ladungstransport erwarteten 0 mV deutet darauf hin, dass es sich bei dem der Kanalöffnung vorausgehenden Einwärtsstrom nicht ausschließlich um eine Ladungsverschiebung, sondern um einen aktiven Ladungstransport handelt.

Bei pH_{i,e} 7,2 scheint der frühe Pumpstrom im Vergleich zum anschließenden passiven Kanalstrom besonders ausgeprägt zu sein und übertrifft diesen um mehr als das Fünffache (Abb. 4.19 f). Interessanterweise bedarf der frühe Einwärtspumpstrom nicht des vollständigen Kanalschließens und kann trotz einer langsamen Kanalschließkinetik von $\tau = 1,7 \pm 0,3$ s (Tab. A.3) mit einer Frequenz von 20 Hz wiederholt ausgelöst werden (Abb. 4.19 g) und nimmt in Folge wiederholter Belichtung sogar zu, während der späte Kanalstrom geringfügig abnimmt (Abb. 4.19 h). Die Zunahme des einwärtsgerichteten Ladungstransportes bei wiederholter Belichtung deutet auf eine komplexe Photochemie sowie die Abfolge unterschiedliche lichtinduzierte Prozesse hin, wie sie auch für einwärtsgerichtete Protonenpumpen diskutiert werden [Inoue et al., 2016, 2018].

4.3 Der grünlichtaktivierte Protonenkanal CsChR

Unter allen untersuchten ChRs weist CsChR aus der Alge *Chloromonas subdivisa* die höchste Protonenselektivität auf (siehe Abschnitt 4.1.1) und zeigt im Gegensatz zum ebenfalls hoch protonenselektiven DsChR1 aus der Alge *Dunaliella salina* auch bei neutralem pH-Wert noch große Photoströme. Für Chrimson konnte gezeigt werden, dass protonierbare Aminosäuren der extrazellulären Halbpore an den Positionen der Glutaminsäuren E4' und E5' in Helix 2 entscheidend für die Protonenleitung sein können (siehe Abschnitt 4.2.8). Insbesondere E4' ist jedoch in CsChR nicht konserviert, sondern durch ein Glycin substituiert (Abb. 4.20 a). Auch in DsChR1 befindet sich an der Position von E4' mit einem Valin eine neutrale Aminosäure (Abb. 4.20 b) und die molekularen Bestimmungsfaktoren der Protonenleitung scheinen sich von Chrimson zu unterscheiden. Für einen proteinübergreifenden Vergleich der Protonenleitung wurden wie in Chrimson auch in CsChR porenflankierende Reste entlang Helix 2 ausgetauscht und der Einfluss auf die Farbsensitivität, Photostromdichte, Schließkinetik und die Protonenselektivität des in HEK293 Zellen exprimierten Proteins bestimmt (Tab. A.5).

Das Wiedereinführen von E4' mit der Mutante G134E führt anders als in Chrimson zu keiner Farb-

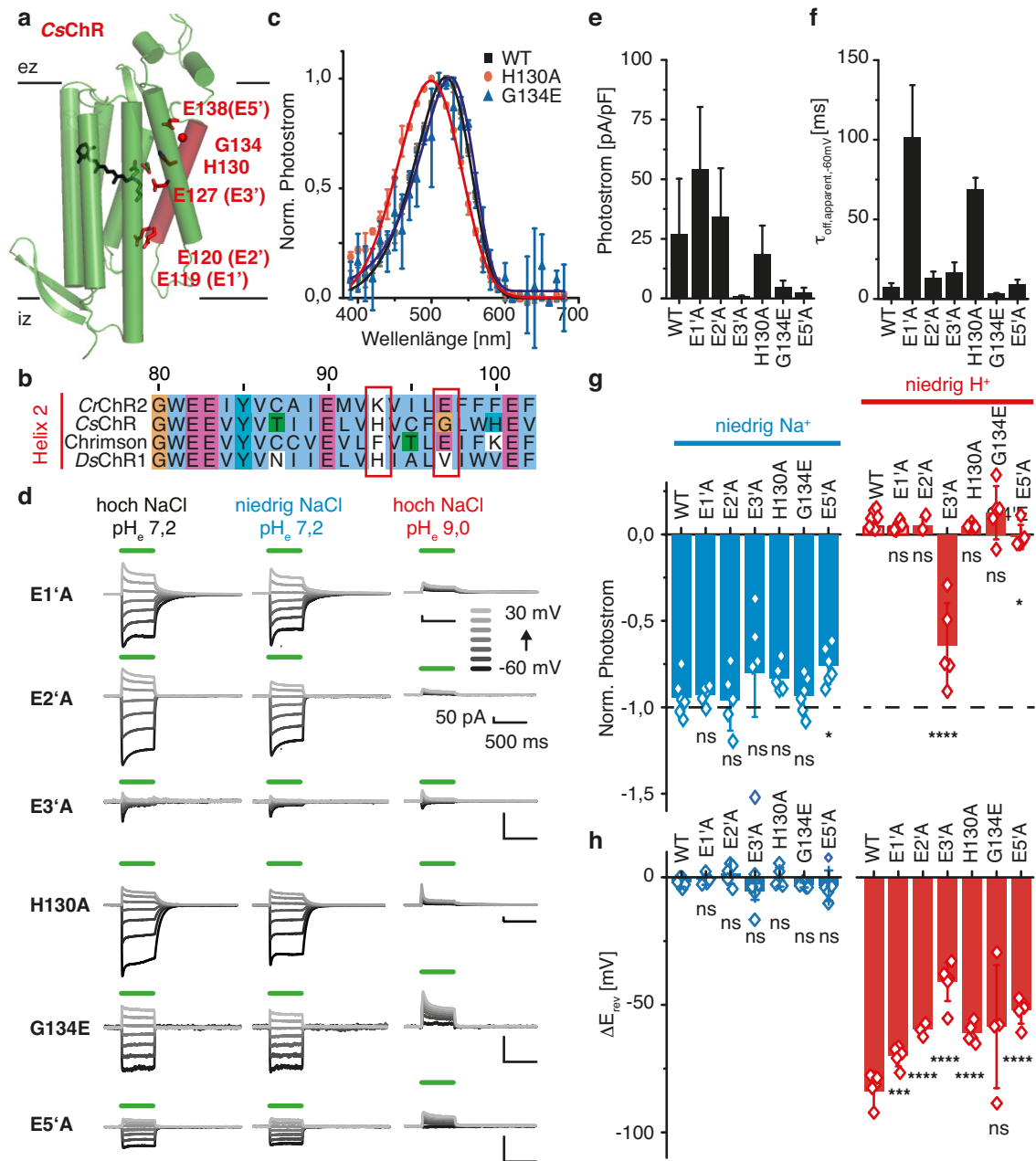


Abbildung 4.20: Molekulare Bestimmungsfaktoren der Protonenleitung von CsChR (a) Homologie-Modell von CsChR auf der Basis von PDB:4yzi (C1C2) erstellt mit dem Swiss-Model-Server [Waterhouse et al., 2018] und dargestellt mit Helix 2 in rot. (b) Sequenzvergleich von Helix 2 in *CrChR2* sowie den Protonenselektiven ChRs *CsChR*, *Chrimson* und *DsChR1*. Hervorgehoben sind homologe Positionen in *DsChR1* und *CsChR*. (c) Aktionsspektren von *CsChR* WT und Mutanten. (d) Repräsentative Photoströme von *CsChR*-Mutanten in 110 mM NaCl pH_e 7,2 (links), 1 mM NaCl pH_e 7,2 (mitte) und 110 mM NaCl pH_e 9,0 (rechts) mit intrazellulär 110 mM NaCl pH_i 7,2. (e) Photostromdichten von *CsChR* und Mutanten. (f) Apparente Schließkinetik von *CsChR* und Mutanten. (g) Normalisierte Photostromamplituden bei -60 mV nach Reduktion der extrazellulären Na^+ -Konzentration (links) oder H^+ -Konzentration (rechts), gemessen wie in (d). Die gestrichelte Linie markiert den Photostrom bei hoher und symmetrischer Na^+ - und H^+ -Konzentration. (h) Umkehrpotentialverschiebung nach Reduktion der extrazellulären Na^+ -Konzentration (links) oder H^+ -Konzentration (rechts), gemessen wie in (d). Aktionsspektrum (c), Photostromdichte (e) und Photostromkinetik (f) wurden in intra- und extrazellulär 110 mM NaCl $pH_{i,e}$ 7,2 bei -60 mV gemessen. Alle Daten zeigen $M \pm SD$. Absolute Größen und die Anzahl unabhängiger Messungen finden sich in Tab. A.5.

verschiebung des Aktionsspektrums von CsChR (Abb. 4.20 c). Die Mutation H130A an der Position von F135 aus Chrimson verschiebt hingegen die Proteinabsorption hypsochrom um ~ 20 nm und könnte auch in CsChR die Stabilisierung der RSBH⁺ durch den Gegenionkomplex beeinflussen.

Photostromdichten sind genau wie in Chrimson auch in CsChR für Mutanten der äußeren Pore (G134E und E5'A) stark reduziert und für E1'A vergleichbar groß wie im WT (Abb. 4.20 d und e). Anders als in Chrimson ist jedoch in CsChR auch der Photostrom von E2'A groß, wohingegen für die Mutante E3'A nahezu kein Photostrom mehr gemessen werden konnte. Trotz starker Reduktion der Photostromdichte in E3'A und E5'A ist die Photostromschließkinetik für beide Mutanten kaum verändert (Abb. 4.20 f). Das Einfügen von E4' (G134E) beschleunigt hingegen das Kanalschließen. Im intrazellulären Tor ist die Bedeutung von E1' und E2' für den Photostromrückgang im Vergleich zu Chrimson vertauscht und das Kanalschließen ist wie in CrChR2 [Sugiyama et al., 2009] insbesondere für E1'A verlangsamt.

Die Reduktion der extrazellulären Na⁺-Konzentration hat in allen Helix-2-Mutanten nur einen geringen Einfluss auf die normalisierten Photostromamplituden und ausschließlich in der E5'A-Mutante sind die normalisierten Photoströme statistisch signifikant reduziert (Abb. 4.20 d und g links). Auch bei einer Reduktion der extrazellulären H⁺-Konzentration sind für E5'A - anders als im CsChR WT - weiterhin kleine Einwärtsströme zu beobachten und die Protonenselektivität der E5'A-Mutante scheint im Vergleich zum WT leicht reduziert (Abb. 4.20 d und g rechts). Für die E3'A-Mutante sind schließlich unter allen Bedingungen nur noch kleine transiente Ströme zu beobachten, welche sich sowohl bei einer Reduktion der extrazellulären Na⁺- als auch der extrazellulären H⁺-Konzentration nur wenig ändern und auch auf residuale Protonentransferprozesse zurückgeführt werden könnten. Im Gegensatz zu Chrimson ist in keiner Helix-2-Mutante das Umkehrpotential bei einer Reduktion der extrazellulären Na⁺-Konzentration signifikant verschoben (Abb. 4.20 h). Entsprechend führt die Reduktion der Protonenleitfähigkeit in CsChR nicht - oder im Fall von E5'A nur äußerst eingeschränkt - zu einer Zunahme der Na⁺-Selektivität.

Zusammengefasst sind in CsChR insbesondere E3' und E5' für eine effiziente Protonenleitung von Bedeutung. Während E5'A die Protonenselektivität leicht reduziert, scheint E3'A eine passive Protonenleitung fast vollständig zu unterbinden.

4.4 Aktiver und passiver Protonentransport der Protonenpumpe CsR

Sowohl in CsChR als auch in Chrimson wird eine effiziente Protonenleitung durch eine Glutaminsäure am äußeren Ende der Pore (Position E5') gefördert. Auch im humanen spannungsaktivierten Protonenkanal H⁺Hv1 und der F₀F₁-type H⁺-ATPase aus *E. coli* sind Carbonsäuren in einer Porenverengung entscheidend für die selektive Protonenleitung (D112 in H⁺Hv1 [Musset et al., 2011] und D61 in der H⁺-ATPase [Miller et al., 1990]). In beiden Proteinen wird die Asparaginsäure flankiert von einem Arginin (R208 in Hv1 und R210 in der ATPase), welches ebenfalls zur Protonenleitung beiträgt [Dudev et al., 2015]. Auch in Chrimson und CsChR befindet sich E5' in direkter Nachbarschaft des hochkonservierten Arginins (R162 in Chrimson). In der Protonenpumpe CsR separiert R83 die Asparaginsäuren des Gegenionkomplexes (D86 und D211) von den

Glutaminsäuren der Protonabgabegruppe (E193 und E203) und bildet in der Dunkelstruktur eine potentielle Wasserbrücke mit Y14 am äußeren Ende von Helix 1 ($3,1 \text{ \AA}$) [Fudim et al., 2019] (Abb. 4.21 a). Y14 befindet sich hierbei an der äußeren Kontaktfläche von Helix 1, 2, 3 und 7 in räumlich ähnlicher Position wie E5' in Chrimson und CsChR.

Bei symmetrischer H^+ - und Na^+ -Konzentration sind die Photoströme der Protonenpumpe CsR sowohl unter 500 ms Dauerbelichtung als auch nach ns-Laseranregung bei allen gemessenen Spannungen ausschließlich auswärtsgerichtet (Abb. 4.21 b). Unter kontinuierlicher Belichtung für 500 ms

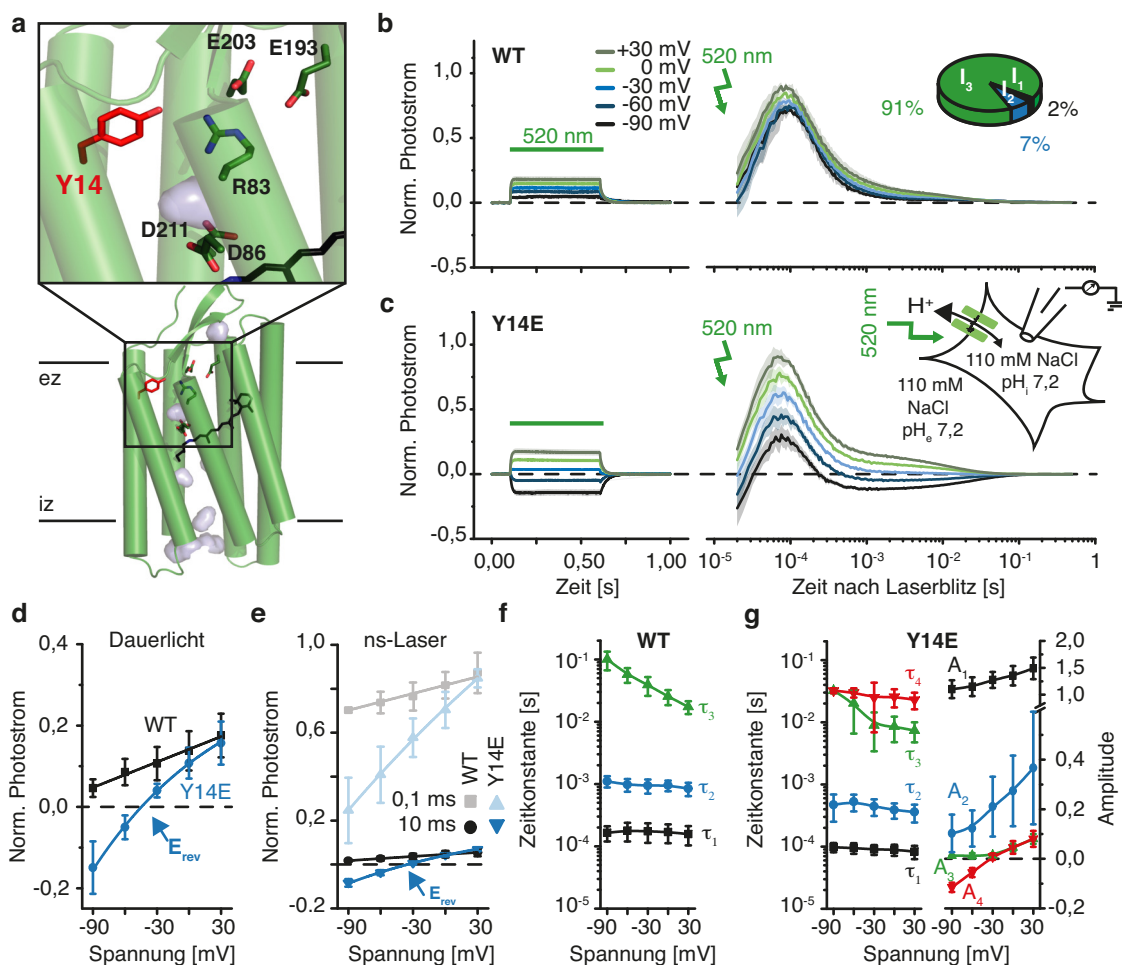


Abbildung 4.21: Protonentransport in CsR und CsR Y14E (a) Proteinkristallstruktur von CsR WT (PDB:6gyh) [Fudim et al., 2019] und wichtige Aminosäuren der äußeren Halbpore. (b) Gemittelte Photoströme von CsR WT in 110 mM Na^+ und $\text{pH}_{i,e}$ 7,2 nach Anregung mit 520 nm Dauerlicht (links) und einem 7 ns-Laserpuls (rechts). In beiden Fällen wurden die Photoströme auf den maximalen Auswärtsstrom nach Laseranregung normalisiert und gemittelt ($n = 3-6$ verschiedene Zellen). Einschub: Anteil der verschiedenen kinetischen Photostromkomponenten nach Laseranregung zum Gesamtladungstransport entsprechend (f). Berechnet wurde der Ladungstransport einer einzelnen kinetischen Komponente als Fläche unter dem jeweiligen Anteil der Photostromkurve. (c) Wie (b) für die Mutante CsR Y14E ($n = 5-6$). Einschub: Experimenteller Aufbau mit intra- und extrazellulär symmetrischer Ionenkonzentration. (d) Normalisierte Photostromamplituden entsprechend (b) und (c) links. (e) Normalisierte Photostromamplituden entsprechend (b) und (c) rechts sowohl 0,1 ms (grau, hellblau) und 10 ms (schwarz, dunkelblau) nach Laseranregung. (f) Zeitkonstanten des Photostromrückganges entsprechend (b) rechts. (g) Zeitkonstanten und kinetische Amplituden des Photostromrückganges entsprechend (c) rechts. (b) und (c) repräsentieren $M \pm \text{SE}$ und (d) bis (g) $M \pm \text{SD}$.

nimmt die Photostromamplitude mit steigender Spannung zu (Abb. 4.21 d). In den zeitaufgelösten Messungen nach Laseranregung zeigt sich hierbei, dass der Photostrom vor allem spät im Photozyklus (10 ms nach Anregung) zunimmt, wohingegen sich Photoströme kurz nach Anregung bei verschiedenen Spannungen kaum unterscheiden (Abb. 4.21 e). Während die Photostromentstehung zeitlich nicht vollständig in Whole-cell-patch-Clamp-Messungen (Zeitauflösung $> 50 \mu\text{s}$) aufgelöst wird, kann der Rückgang des Photostroms durch drei Zeitkonstanten beschrieben werden (Abb. 4.21 f). Ausschließlich die langsamste Zeitkonstante τ_3 ist hierbei spannungsabhängig und der Photozyklus bei positiven Spannungen beschleunigt. Der Beitrag der einzelnen Photozyklusübergänge zum Ladungstransport kann schließlich als Integral der verschiedenen kinetischen Komponenten bestimmt werden. Trotz kleiner Photostromamplitude erfolgen mehr als 90% des Ladungstransportes im langsamsten Protonentransportschritt (während τ_3) (Abb. 4.21 b Einschub).

Das Einfügen einer einzelnen zusätzlichen Glutaminsäure an der Position von Y14 und somit in direkter Nachbarschaft von R83 stört die Unidirektionalität des Protonentransportes und führt zu Einwärtsströmen bei negativen Spannungen (Abb. 4.21 c). Einwärtsströme sind ausschließlich bei negativer Spannung sowie $\sim 1 - 10$ ms nach Anregung zu beobachten und erfolgen entsprechend im Zeitbereich der spannungsabhängigen Photozyklusübergänge des WT's spät im Photozyklus. Anders als im *CsR* WT, kann für die Photoströme der *CsR*-Y14E-Mutante ein Umkehrpotential bestimmt werden (Abb. 4.21 d und e), welches sowohl unter Dauerlicht als auch nach Laseranregung von den für einen ausschließlich passiv leitenden Kanal zu erwartenden 0 mV abweicht ($E_{rev,Dauerlicht} = -44 \pm 6$ mV und $E_{rev,Laser} = -34 \pm 5$ mV) (Abb. 4.21 d und e) und die Restpumpaktivität der *CsR*-Y14E-Mutante widerspiegelt. Insbesondere im frühen Photozyklus (0,1 ms nach Anregung) sind auch in der Y14E-Mutante Photoströme ausschließlich auswärtsgerichtet (Abb. 4.21 e) und die beiden schnellen Zeitkonstanten des Photostromrückganges (τ_1 und τ_2) im Vergleich zum WT nur leicht beschleunigt (Abb. 4.21 g links). Im späten Photozyklus (1 ms-10 ms) können dagegen Einwärtsströme bei negativen Spannungen (Abb. 4.21 e) sowie eine vierte nahezu spannungsunabhängige Zeitkonstante τ_4 bestimmt werden (Abb. 4.21 g). Aufgrund der zusätzlichen Zeitkonstante ist der Photostromrückgang in *CsR* Y14E bei negativen Spannungen dreifach schneller als im WT. Einwärtsströme nehmen zwischen -60 mV und -90 mV in Y14E weiterhin zu, ohne dass sich die Kinetik des Photostroms verändert, und Protonenleitung und Proteinkinetik sind in der undichten Protonenpumpe *CsR* Y14E bei negativen Spannungen entkoppelt.

4.5 Protonenleitung im Photozyklus von *CrChR2*

Während in den vorigen Kapiteln die Unterschiede der Protonenleitung verschiedener mikrobieller Rhodopsine beschrieben wurden, ändern sich in *CrChR2* aus *Chlamydomonas reinhardtii* Protonenleitung und Selektivität auch innerhalb des Photozyklus eines einzelnen Rhodopsins [Schneider et al., 2015]. Entsprechend nimmt unter Dauerbelichtung die Protonenselektivität von *CrChR2* zwischen transientem und stationärem Strom zu, während gleichzeitig der Gesamtphotostrom abnimmt [Berndt et al., 2010]. Aus den Änderungen der Protonenselektivität konnte bisher ausschließlich indirekt auf unterschiedliche leitende Zustände geschlossen werden, welche durch

Anregung mit einem ns-Laserpuls direkt betrachtet und kinetisch unterschieden werden können.

Auch Nanosekunden-Laserblitze führen hierbei zu einer Inaktivierung des Photostroms. Der Grad der Inaktivierung hängt interessanterweise nicht nur von der angelegten Spannung sondern auch von der Belichtungsfrequenz ab (Abb. 4.22 a und b). Selbst mit einer Belichtungsfrequenz von 20 Hz den Photostrom sättigender Laserblitze ist der Photostromrückgang geringer als unter kontinuierlicher Belichtung, obwohl die 20 Hz-Stimulation kein vollständiges Schließen aller Kanäle mehr erlaubt. Aufgrund einer stärkeren Inaktivierung bei positiven Spannungen nimmt bei wiederholter Belichtung die Einwärtsgleichrichtung des Photostroms zu. Sind im dunkeladaptierten Protein Photostrome bei 30 mV nur $40 \pm 20\%$ kleiner als bei -30 mV, unterscheiden sich die Ströme bei selben Spannungen bereits um $110 \pm 20\%$ nach wenigen Aktivierungszyklen einer 1 Hz-Belichtung (Abb. 4.22 b).

4.5.1 Zeitliche Evolution der Protonenleitung in CrChR2

Zur Unterscheidung verschiedener leitender Zustände vor und nach Lichtadaptation wurde sowohl das dunkel- als auch das lichtadaptierte CrChR2 durch einen 7 ns-Laserblitz angeregt und Photostrome bei verschiedenen Spannungen gemessen (Abb. 4.23 a). Zur Dunkeladaptation wurde vor jeder Messung 90 s in vollständiger Dunkelheit bei 0 mV gewartet. Zur Lichtadaptation wurden die Zellen hingegen 250 ms vor der Lasermessung für 500 ms bei gleicher Spannung belichtet. Wie in den vorigen Kapiteln wurde ausgehend von einer symmetrischen Na^+ - und H^+ -Konzentration entweder die extrazelluläre Na^+ - oder die extrazelluläre H^+ -Konzentration reduziert (Abb. 4.23 a Mit-

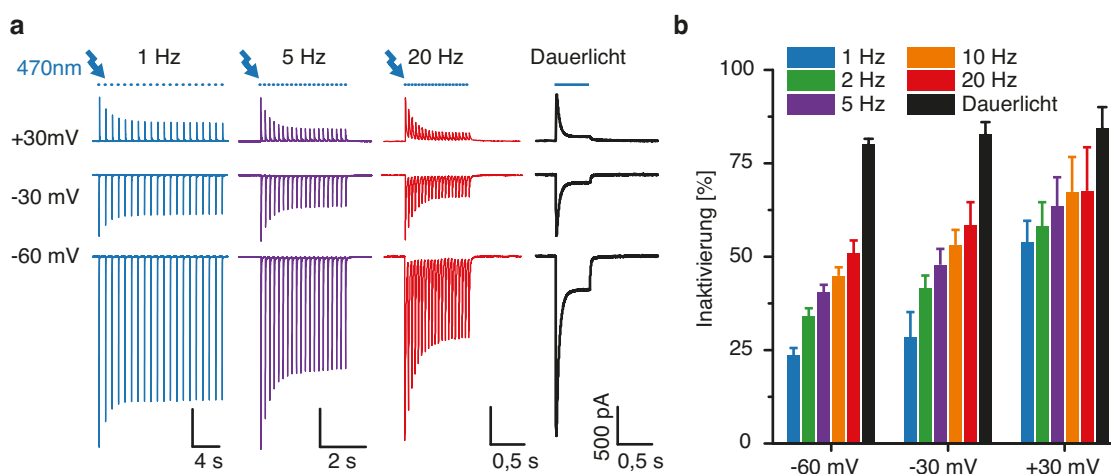


Abbildung 4.22: Inaktivierung von CrChR2 durch 7 ns-Laserblitze (a) Repräsentative Photostrome von CrChR2 WT in 110 mM NaCl und $\text{pH}_{i,e}$ 7,2 bei Aktivierung mit 7 ns-Laserblitzen verschiedener Frequenz oder 500 ms-Dauerbelichtung sowie unterschiedlicher Spannung. **(b)** Photostrominaktivierung bei verschiedenen Spannungen und Belichtungsprotokollen. Dargestellt sind der Photostromrückgang zwischen Photostrom der ersten und letzten Belichtung bzw. vom Peak- bis zum stationären Photostrom nach 500 ms-Dauerbelichtung ($M \pm \text{SD}$, $n = 6$). Die Lichtintensität betrug $100 \mu\text{J}/\text{mm}^2$ pro Laserpuls und $3,4 \text{ mW}/\text{mm}^2$ unter Dauerlicht.

te und unten), um die Protonen- und Kationleitfähigkeit der einzelnen Photozyklusintermediate zu unterscheiden.

In Übereinstimmung mit früheren Messungen von Lórenz-Fonfría et al. [2014] öffnet das dunkeladaptierte CrChR2 biphasisch mit zwei spannungsunabhängigen Zeitkonstanten von 0,16 ms

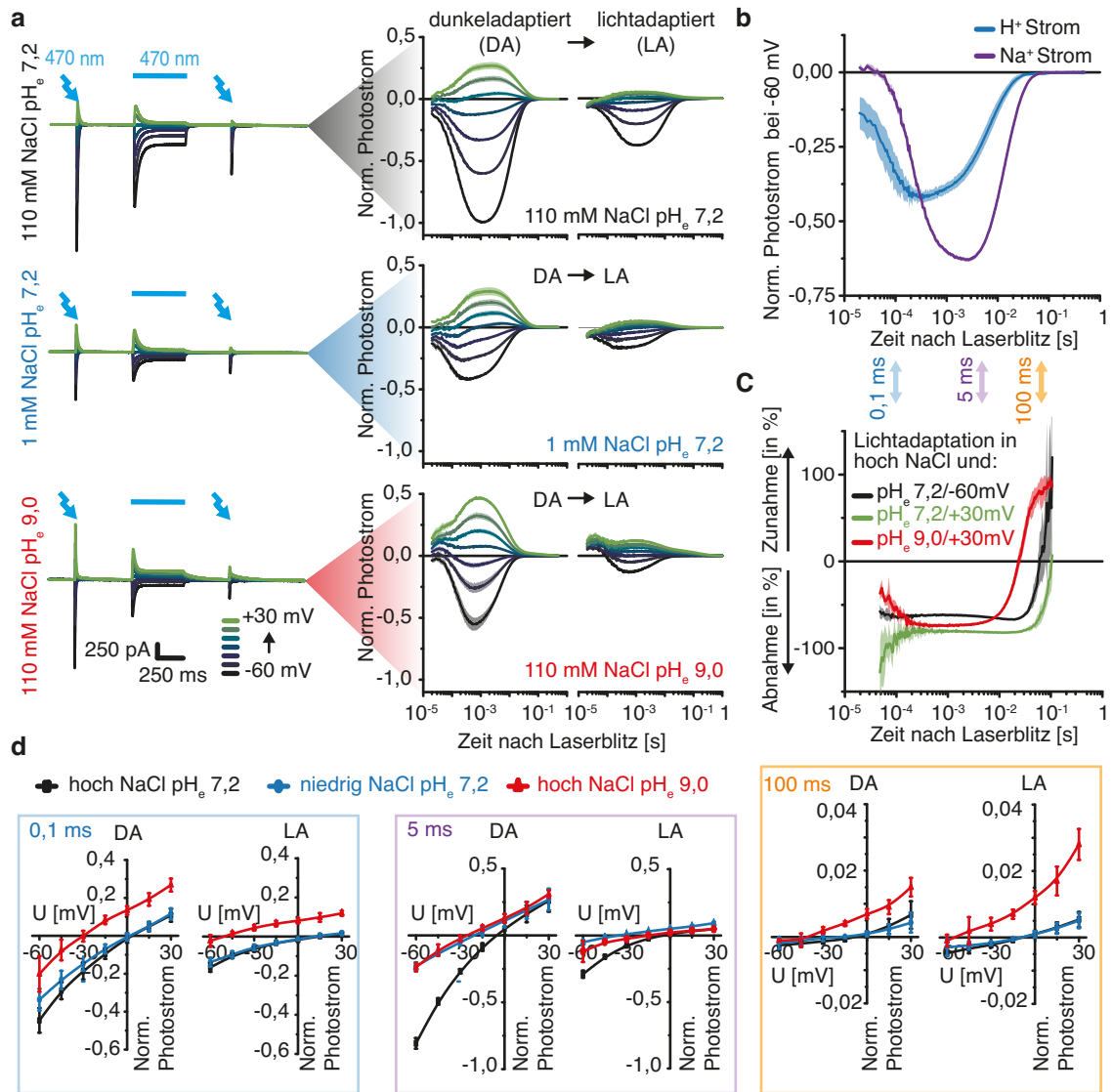


Abbildung 4.23: Zeitliche Entwicklung der Ionenselektivität von CrChR2 (a) Photoströme von CrChR2 bei Anregung mit einem 7 ns-Laser bei 470 nm vor und nach Lichtadaptation durch 500 ms-Dauerbelichtung. Die extrazelluläre Lösung wurde ausgetauscht von 110 mM NaCl pH_e 7,2 (oben) zu 1 mM NaCl pH_e 7,2 (Mitte) oder 110 mM NaCl pH_e 9,0 (unten) mit intrazellulär 110 mM NaCl pH_i 7,2. **Links:** Repräsentative Photoströme. **Rechts:** Logarithmische Darstellung der normierten und gemittelten Photoströme vor (links) und nach (rechts) Lichtadaptation ($M \pm SE$, $n=5-8$). (b) Zeitliche Entwicklung des H⁺- und des Na⁺-Flusses des dunkeladaptierten Proteins bei -60 mV, entweder direkt gemessen bei extrazellulär 1 mM Na⁺ und pH_e 7,2 (für den H⁺-Fluss) oder für den Na⁺-Fluss berechnet ($I_{Na^+} = I(110 \text{ mM NaCl pH}_e 7,2) - I(1 \text{ mM NaCl pH}_e 7,2)$) ($M \pm SE$; $n=5-8$). (c) Relative Photostromänderung nach Lichtadaptation ($(I(LA) - I(DA)) / I(DA)$) ($M \pm SE$, $n=5-8$). (d) Stromspannungskurven normalisierter Photoströme 0,1 ms, 5 ms und 100 ms nach Anregung und vor (DA) sowie nach (LA) Lichtadaptation ($M \pm SD$, $n=5-8$). Zeitkonstanten der Photostromkinetik sind in Tab. A.6 zusammengefasst.

und 2,5 ms (Abb. 4.23 a oben). Das Kanalschließen erfolgt hingegen nahezu monoexponentiell mit einer dominanten spannungsabhängigen Zeitkonstante von 10 - 22 ms (97-99% des Zerfalls) (Tab. A.6). Bei 0 mV (in der Abwesenheit eines elektrochemischen Gradienten) ist kein früher Photostrom wie für CsR zu beobachten und ein geringer, vom elektrochemischen Gradienten unabhängiger Auswärtsstrom kann ausschließlich spät im Photozyklus 5-10 ms nach Anregung vermutet werden.

Nach Reduktion der extrazellulären Na^+ -Konzentration sind Einwärtsströme (Abb. 4.23 a Mitte) nicht nur um die Hälfte reduziert, sondern ändern überraschenderweise auch ihren zeitlichen Verlauf. Wohingegen unter symmetrischer Ionenkonzentration bei -60 mV sowohl Na^+ als auch H^+ geleitet werden, fließen nach Austausch des extrazellulären Na^+ durch NMDG⁺ fast ausschließlich H^+ in die Zelle. Der H^+ -Strom erreicht hierbei seine maximale Amplitude bereits 0,3 ms nach Anregung (Abb. 4.23 b), der Na^+ -Strom - berechnet durch Subtraktion des Protonenstroms vom Einwärtsstrom unter symmetrischen Bedingungen - hingegen erst deutlich später (2,5 ms nach Anregung). Bereits im dunkeladaptierten CrChR2 ändert sich somit die Protonenselektivität im Laufe der Kanalöffnung und zwei unterschiedliche Offenzustände können funktional unterschieden werden.

Nach Lichtadaptation durch 500 ms Dauerbelichtung ist die Photostromamplitude stark reduziert. Trotzdem öffnet und schließt der Kanal weiterhin biphasisch (Tab. A.6) und erreicht den maximalen Photostrom zum gleichen Zeitpunkt nach Belichtung wie das dunkeladaptierte Protein (Abb. 4.23 a oben). Die relative Photostromänderung zu verschiedenen Zeitpunkten nach Anregung zeigt eine nahezu homogene Reduktion des Photostroms um 60-80% im Zeitraum von 0,2 ms bis 10 ms nach Belichtung (Abb. 4.23 c). Demgegenüber unterscheiden sich die Photostromänderungen sowohl kurz nach der Anregung (vor 200 μs) und während des langsamen Photostromrückganges (später als 50 ms) deutlich von einem ansonsten homogenen Rückgang des Photostroms und implizieren alternative elektrogene Prozesse im frühen und späten Photozyklus des lichtadaptierten Proteins. Besonders 100 ms nach Anregung ist sogar eine Zunahme des späten Photostroms - vor allem bei $\text{pH}_e 9,0$ - zu beobachten, welche auf einen zusätzlichen, langsam zerfallenden Offenzustand geringer Leitfähigkeit hindeutet. Zusammengefasst lassen sich somit wenigstens drei unterschiedliche leitende Zustände für CrChR2 beobachten: ein früher $O_{1,frueh}$ und später $O_{1,spael}$ im dunkeladaptierten Protein sowie der langlebige O_2 nach Lichtadaptation.

Strom-Spannungskurven zu drei verschiedenen Zeitpunkten nach Anregung (0,1 ms, 5 ms und 100 ms) erlauben es, Unterschiede der Protonenselektivität der drei verschiedenen Offenzustände zu quantifizieren (Abb. 4.23 d). Entsprechend unterscheiden sich Photostrome 0,1 ms und 100 ms nach Anregung kaum bei hoher oder niedriger Na^+ -Konzentration, zeigen jedoch eine deutliche Reduktion des Einwärtsstromes sowie eine ausgeprägte Verschiebung des Umkehrpotentials nach Reduktion der extrazellulären H^+ -Konzentration. Im Gegensatz dazu führt 5 ms nach Anregung sowohl die Reduktion der extrazellulären H^+ -Konzentration als auch der extrazellulären Na^+ -Konzentration sowohl zu einer Abnahme des Einwärtsstromes als auch zu einer Verschiebung des Umkehrpotentials. Nach Öffnen des Kanals wird entsprechend der kurzlebige H^+ -selektive $O_{1,frueh}$ gefolgt von einem sowohl Na^+ - als auch weiterhin H^+ -leitenden Offenzustand $O_{1,spael}$. Nach wiederholter Belichtung entsteht schließlich mit O_2 ein dritter, langlebiger Offenzustand

hoher Protonenselektivität, der trotz vermeintlich kleiner Leitfähigkeit aufgrund einer langen Lebenszeit wesentlich zum Gesamtphotostrom unter stationärer Belichtung beiträgt.

4.5.2 Zeitliche Evolution der Protonenleitung in *CrChR2* E90Q

In *CsChR* konnte die Helix-2-Glutaminsäure E3' als wichtiger Bestimmungsfaktor der Protonenleitung identifiziert werden (siehe Abschnitt 4.3). Auch in *CrChR2* wird die Protonenselektivität durch Mutationen von E3' (E90) entschieden beeinflusst [Eisenhauer et al., 2012, Ruffert et al., 2011]. E3' ist in der Dunkelstruktur von *CrChR2* [Volkov et al., 2017] auswärtsgeklappt und interagiert über das Wasser 1207 mit den Gegenionkomplex-Seitenketten (Abb. 4.24 a), wohingegen E3' in der Dunkelstruktur von C1C2 als Zentrales Tor Wasserstoffbrückenbindungen zu S102 und N297 bildet (siehe Abb. 1.4).

Der genaue Einfluss von E3' auf die Protonenselektivität der unterschiedlichen leitenden Zustände von *CrChR2* ist unbekannt. Somit wurden auch für die *CrChR2*-E90Q-Mutante zeitaufgelöste Ionenselektivitätsmessungen nach Anregung durch 7 ns-Laserblitze sowohl vor als auch nach Lichtadaptation durchgeführt (Abb. 4.24 b). Die Inaktivierung des Photostroms bei 500 ms Dauerbelichtung ist für die E3'Q-Mutante mit einem Photostromrückgang um $62 \pm 3\%$ nur leicht geringer als für den WT ($78 \pm 3\%$). Nichtsdestotrotz unterscheiden sich die Photoströme von E90Q und WT in drei wesentlichen Punkten. Zum Ersten wird in E90Q sowohl der maximale Einwärtsstrom für Protonen als auch für Natriumionen bereits 0,15 ms sowie 1,2 ms nach Anregung erreicht und somit deutlich früher als im WT (maximale Amplituden nach 0,3 ms für H^+ und 2 ms für Na^+) (Abb. 4.24 c). Zweitens ist für E90Q 2 ms nach Anregung der Protoneneinstrom kleiner und der Natriumeinstrom größer als im WT und vor allem die Protonenselektivität des $O_{1,spael}$ scheint reduziert, wie ein Vergleich der Umkehrpotentialverschiebungen der E90Q-Mutante und des WT im gleichen Zeitbereich bestätigt (Abb. 4.24 d und e). Und schließlich kommt es für E90Q nach Lichtadaptation anders als im WT auch bei pH_e 9,0 zu einer homogenen Photostromabnahme über den gesamten Zeitbereich (Abb. 4.24 f). Während der Photostrom des WT 100 ms nach Anregung zunimmt, nimmt der Photostrom von E90Q im gleichen Zeitfenster ab. Obwohl *CrChR2* E90Q unter Dauerlicht inaktiviert, scheint O_2 nicht gebildet zu werden oder ist in seiner Leitfähigkeit dramatisch reduziert (Abb. 4.24 g und h). Die Aminosäure E3' ist somit in *CrChR2* sowohl für die Protonenleitung von $O_{1,spael}$ wichtig als auch für die Ionenleitung des lichtadaptierten Proteins im O_2 unentbehrlich. In der *CrChR2*-E90Q-Mutante leitet entsprechend der syn-Photozyklus nicht.

4.5.3 Molekulare Modulatoren der Photozykluskinetik in *CrChR2*

Von besonderer Bedeutung für die Kanalschließkinetik von Chrimson erwies sich M201 in der Retinalbindetasche (siehe Abschnitt 4.2.4), wohingegen in *CrChR2* das benachbarte DC-Paar (Abb. 4.25 a) für ein schnelles Kanalschließen unersetzlich ist [Bamann et al., 2010, Berndt et al., 2009]. Obwohl in *CrChR2* die Mutation D156C (benannt als ChR2-XXL) zu einer um mehr als drei Größenordnungen verlangsamten Schließkinetik führt [Dawydow et al., 2014], erfolgt der Photostromrückgang von Chrimson trotz homologer Substitution im DC-Paar schnell. *CrChR2* D156C unterscheidet sich von Chrimson insbesondere in der Position von T159 (M201 in Chrimson) und

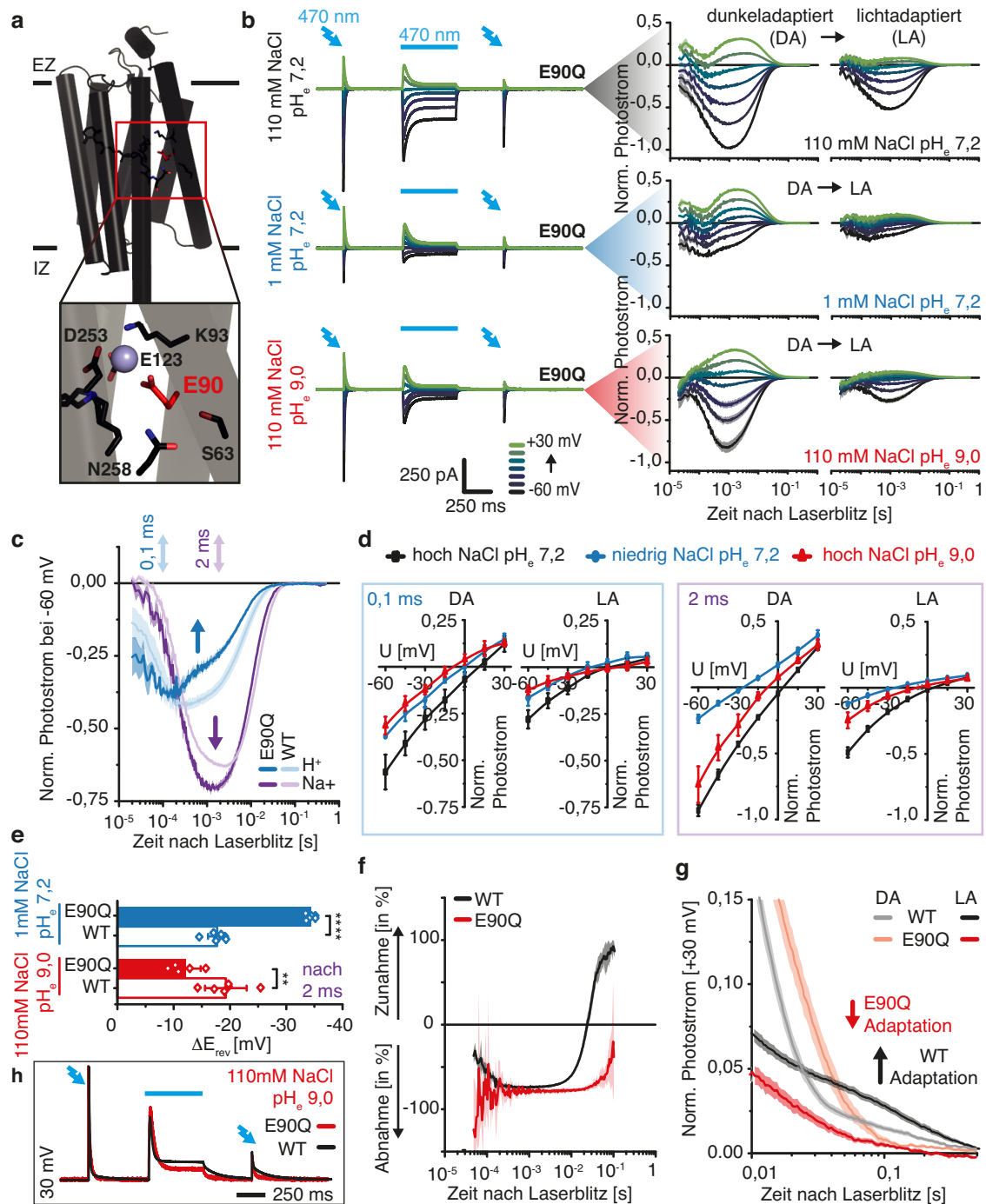


Abbildung 4.24: Zeitliche Entwicklung der Ionenselektivität von *CrChR2* E90Q vor und nach Lichtadaptation (a) Kristallstruktur von *CrChR2* (6eid [Volkov et al., 2017]) mit E90 (E3') in rot. (b) Photoströme von *CrChR2* E90Q bei Anregung mit einem 7 ns-Laser vor und nach Lichtadaptation bei verschiedener extrazellulärer H⁺ und Na⁺-Konzentration **Links**: Repräsentative Photoströme. **Rechts**: Logarithmische Darstellung der normierten und gemittelten Photoströme vor und nach Lichtadaptation (M ± SE, n=5-6). (c) Zeitliche Entwicklung des H⁺ und Na⁺-Flusses des dunkeladaptierten Proteins bei -60 mV (M ± SE, n=6). (d) Stromspannungskurven der normalisierten Photoströme 0,1 ms und 2 ms nach Anregung vor (DA) sowie nach (LA) Lichtadaptation (M ± SD; n=5-8). (e) Umkehrpotentialverschiebung entsprechend (b) und (d) für das dunkeladaptierte Protein 2 ms nach Anregung. (f) Relative Photostromänderung nach Lichtadaptation bei 30 mV ((I(LA)-I(DA))/I(DA)) (M ± SE, n=5). (g+h) Vergleich der Photoströme von WT und E90Q bei 30 mV in 110 mM NaCl pH_e 9,0 vor und nach Lichtadaptation (M ± SE; n=5).

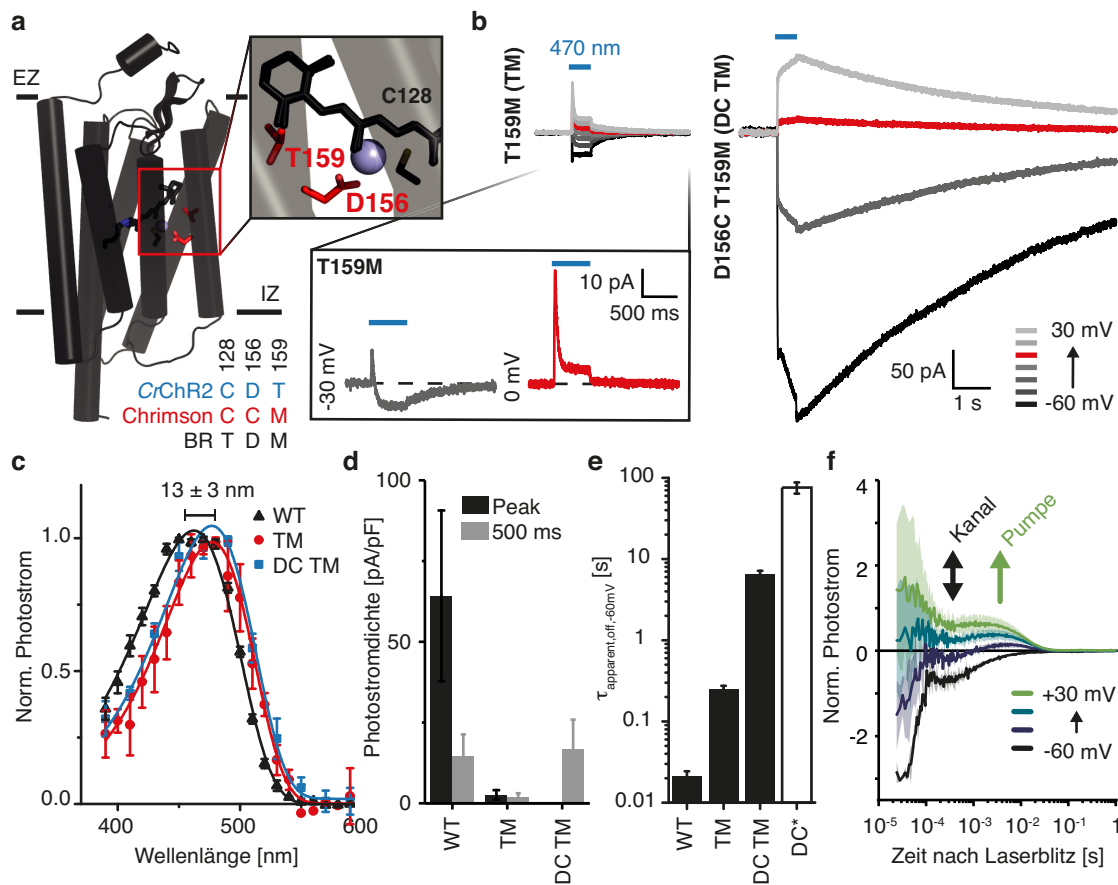


Abbildung 4.25: Photoströme von CrChR2 T159M und CrChR2 D156C T159M in HEK293-Zellen (a) Kristallstruktur von CrChR2 (6eid [Volkov et al., 2017]) mit D156 und T159 in rot (oben) sowie einem Sequenzvergleich der homologen Positionen in Chrimson und BR (unten). (b) Repräsentative Photoströme von CrChR2 T159M und CrChR2 D156C T159M in intra- und extrazellulär 110 mM NaCl pH_{i,e} 7,2. (c) Aktionsspektren von CrChR2 WT und Mutanten (TM = T159C, DC TM = D156C T159M, n=4-6). (d) Photostromdichte des Peakstroms sowie des stationären Photostroms bei -60 mV (n=7). (e) Apparente Schließkinetik des Kanals (n=6). Die Kinetik von D156C (DC*) ist der Literatur entnommen [Dawydow et al., 2014]. (f) Photoströme von CrChR2 T159M nach Anregung mit einem 7 ns-Laserblitzen in den Ionenbedingungen aus (b) (M ± SE, n = 2). Alle Datenpunkte in (c)-(e) wurden bei -60 mV unter den Bedingungen aus (b) gemessen und sind als M ± SD dargestellt.

das zusätzliche Methionin könnte ein schnelles Kanalschließen trotz Substitution des DC-Paares ermöglichen. Eine erste Beschreibung der CrChR2 T159M Mutante erfolgte in *Xenopus laevis* Oozyten in der Dissertation von Dr. André Berndt [Berndt, 2011], erlaubte jedoch aufgrund der fehlenden Kontrolle über die intrazelluläre Ionenkomposition keine schlüssige Interpretation der auch bei negativen Spannungen beobachteten Auswärtsströme.

Sowohl CrChR2-T159M als auch die zu Chrimson korrespondierende Doppelmutante CrChR2-D156C-T159M wurden in HEK293-Zellen exprimiert und unter symmetrischer Protonen- und Natriumkonzentration untersucht (Abb. 4.25 b). Entsprechend der Bedeutung für die Rotlichtabsorption von Chrimson [Oda et al., 2018], führt auch in CrChR2 die Substitution von T159 durch das raumgreifendere Methionin sowohl für T159M als auch für die D156C-T159M-Doppelmutante zu einer bathochromen Verschiebung des Aktionsspektrums um 13 nm (Abb. 4.25 c). Gleichzei-

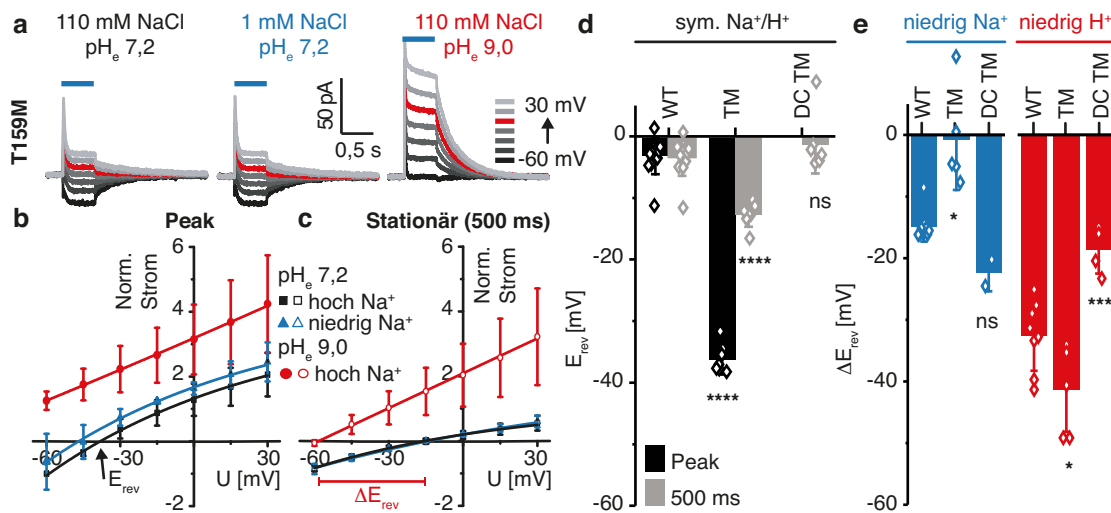


Abbildung 4.26: Ionenselektivität von *CrChR2* T159M und D156C T159M (a) Repräsentative Photostrome von *CrChR2* T159M in 110 mM NaCl pH_e 7,2 (links), 1 mM NaCl pH_e 7,2 (Mitte) und 110 mM NaCl pH_e 9,0 mit intrazellulär 110 mM NaCl pH_e 7,2 bei Belichtung mit 470 nm. (b und c) Stromspannungskurven des initialen Peakphotostroms (links) sowie des stationären Photostroms nach 500 ms Belichtung (rechts). (d) Umkehrpotential des Peakphotostroms (schwarz) und des stationären Photostroms (grau) gemessen und ermittelt wie in (a)-(c) und verglichen mittels zweiseitigem t-Test zum WT. (e) Umkehrpotentialverschiebung des stationären Photostroms nach Reduktion der extrazellulären Na^+ -Konzentration (links) oder H^+ -Konzentration (rechts), gemessen wie in (a) und verglichen mit dem WT. Alle Messungen zeigen $M \pm SD$.

tig ist für die *CrChR2*-T159M-Einzelmutante die Photostromdichte stark reduziert (Abb. 4.25 d), wohingegen diese für die Doppelmutante *CrChR2*-D156C-T159M erneut auf die Größe des stationären Photostromdichte des Wildtyps angehoben ist. Nach Belichtung ist die Kanalschließkinetik der *CrChR2* D156C T159M Doppelmutante um eine Größenordnung schneller, als es für *CrChR2* D156C beschrieben wurde [Dawydow et al., 2014] (Abb. 4.25 e). Sowohl in ihrer Photostromdichte als auch ihrer Kinetik scheinen sich die Reste an der Position von D156 und T159 somit gegenläufig im Phänotyp zu beeinflussen.

Überraschenderweise zeigt *CrChR2*-T159M Auswärtsströme bei einem Membranpotential von 0 mV trotz extra- und intrazellulär identischer H^+ - und Na^+ -Konzentration (Abb. 4.25 b), was auf einen aktiven Auswärtstransport von Protonen hindeutet. Nach Anregung mit einem 7 ns-Laserpuls lässt sich der Auswärtspumpstrom dem späten Photozyklus zuordnen (Abb. 4.25 f). Im frühen Photozyklus (zeitgleich zu $O_{1,frueh}$) sind dagegen wie im WT Aus- und Einwärtsströme entsprechend der angelegten Spannung zu beobachten. Unter Dauerbelichtung liegt das Umkehrpotential für den initialen Peakphotostrom bei -36 ± 3 mV und für den stationären Photostrom bei $-13,0 \pm 2,0$ mV und unterscheidet sich entsprechend wesentlich vom WT (Abb. 4.26 a bis d). Der auswärtsgerichtete stationäre Photostrom in der Abwesenheit eines elektrochemischen Gradienten kann schließlich nur durch einen aktiven Ladungstransport von Protonen über die Plasmamembran erklärt werden.

Zur weiteren Untersuchung der Ionenselektivität der *CrChR2*-T159M-Mutante wurde erneut extrazellulär entweder die Na^+ - oder die H^+ -Konzentration reduziert (Abb. 4.26 a). Im Gegensatz zum WT unterscheiden sich die Photostrome von T159M bei hoher und niedriger extrazellulärer

Na^+ -Konzentration kaum (Peak, Abb. 4.26 b) oder gar nicht (stationär, Abb. 4.26 c). Die Reduktion der extrazellulären H^+ -Konzentration führt hingegen zu einer deutlichen Zunahme des Auswärtsstromes (Abb. 4.26 b und c) und zu einer Verschiebung des Umkehrpotentials (Abb. 4.26 e). Die frühe passive Ionenleitung der *CrChR2-T159M*-Mutante scheint somit hoch protonenselektiv zu sein und könnte dem $\text{O}_{1,frueh}$ des WT entsprechen, wohingegen der kationenleitende $\text{O}_{1,spael}$ in der T159M-Mutante möglicherweise kaum leitete bzw. nicht gebildet wird. In der Doppelmutante *CrChR2-D156C-T159M* erfolgt schließlich kein aktiver Ladungstransport mehr und auch die Na^+ -Leitfähigkeit des WT ist wiederhergestellt. Entsprechend unterscheidet sich das Umkehrpotential der D156C-T159M-Mutante unter symmetrischer H^+ und Na^+ Konzentration nicht vom WT (Abb. 4.26 d) und kann sowohl durch die Reduktion der extrazellulären Na^+ -Konzentration als auch der extrazellulären H^+ -Konzentration deutlich verschoben werden (Abb. 4.26 e). Erneut scheinen sich die Mutationen D156C und T159M in ihrer Wirkung auf die Ionenleitung gegenseitig zu beeinflussen und sogar aufzuheben.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass auch in *CrChR2* genau wie in Chrimson ein Methionin in direkter Nachbarschaft des β -Iononringes die Photostromkinetik entscheidend bestimmen kann. Insbesondere in *CrChR2* verändert es darüber hinaus trotz großer Entfernung zur Pore die Protonenselektivität des Kanals und ermöglicht einen aktiven Protonentransport. In der Wirkung beeinflussen sich schließlich das Methionin in Helix 4 sowie Mutanten des DC-Paares gegenseitig und alle drei Positionen müssen für das molekulare Verständnis von ChRs gemeinsam betrachtet werden.

4.6 Zwei-Komponenten-Optogenetik

Die rotverschobene Absorption von Chrimson erlaubt es, dieses unabhängig von anderen optogenetischen Werkzeugen anzuregen [Klapoetke et al., 2014]. In Kombination mit anionleitenden ChRs können somit Membranströme verschiedener Ladungsträger unabhängig voneinander kontrolliert werden. In begrenzten intra- oder extrazellulären Kompartimenten kann weiterhin durch den spezifischen Transport von Protonen deren Konzentration lokal verändert werden, um sekundäre zelluläre Prozesse wie das Öffnen endogener oder koexprimierter Ionenkanäle auszulösen. Als Zwei-Komponenten-Optogenetik werden lichtensitive Proteine entweder miteinander oder mit sekundär aktivierten Effektorproteinen kombiniert, um in neuer Kombination neue lichtgesteuerte Funktionalitäten zu erschließen.

4.6.1 Kanalrhodopsin-Tandem-Konstrukte zur wellenlängenabhängigen Kontrolle der Ionenflüsse

Das Ruhepotential von Nervenzellen resultiert aus einer asymmetrischen Ionenverteilung von Na^+ , K^+ , Ca^{2+} und Cl^- [Hodgkin, 1951]. Entsprechend der im Zellkörper von Neuronen vorliegenden Ionengradienten bewirken Cl^- -leitende ChRs eine Hyperpolarisation bzw. Stabilisierung des Ruhepotentials und protonen- sowie kationleitende ChRs eine Depolarisation des Membranpotentials. Durch die gemeinsame Expression eines hyper- und eines depolarisierenden ChRs unter-

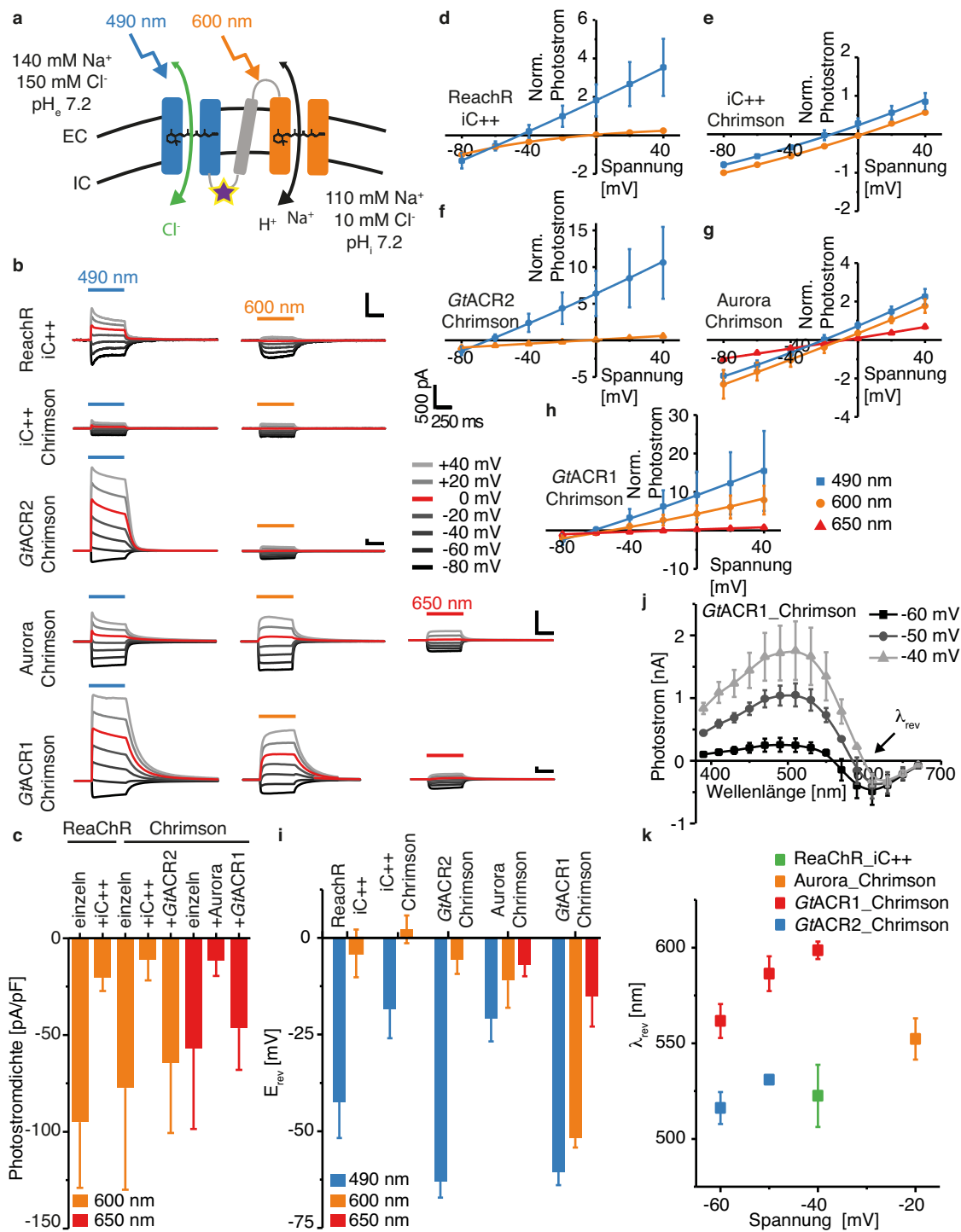


Abbildung 4.27: Kanalrhodopsinfusionskonstrukte (a) Zwei ChRs komplementärer Selektivität für Cl^- und Na^+/H^+ wurden über ein fluoreszierendes Protein (YFP/mCerulean) sowie die β -Untereinheit der H^+/Na^+ -ATPase fusioniert und in HEK-Zellen bei niedriger intrazellulärer Cl^- -Konzentration exprimiert. (b) Repräsentative Photoströme von „ReaChR-YFP-BHK- iC^{++} “, „ iC^{++} -YFP-BHK-Chrimson“, „GtACR2-mCerulean- β BHK-Chrimson“, „Aurora-YFP-BHK-Chrimson“ und „GtACR1-mCerulean- β BHK-Chrimson“ entsprechend (a) mit 490 nm , 600 nm und 650 nm Belichtung. (c) Photostromdichten bei -80 mV entsprechend (a) und (b). (d) - (h) Stromspannungskurven normalisierter Photoströme entsprechend (a) und (b). (i) Umkehrpotentiale der initialen Photoströme bei unterschiedlichen Anregungswellenlängen. (j) Aktionspektren von „GtACR1-Chrimson“ nach Anregung mit 10 ms Lichtpulsen verschiedener Wellenlängen, jedoch gleicher Photonendichte. λ_{rev} beschreibt die Wellenlänge der Photostromrichtungsänderung. (k) λ_{rev} verschiedener Konstrukte entsprechend (j). Alle Daten in (c)-(k) entsprechen $M \pm SD$.

schiedlicher Farbsensitivität könnte die Art der geleiteten Ionen, die Photostromrichtung sowie das Umkehrpotential des Photostroms durch die Wahl der Anregungswellenlänge kontrolliert werden. Zur Kollokalisierung innerhalb der Zelle können beide Rhodopsine direkt über die Transmembrandomäne der β -Untereinheit der H^+/Na^+ -ATPase sowie ein gelb oder cyan fluoreszierendes Protein fusioniert werden - entsprechend früherer Fusionskonstrukte aus Kanalrhodopsinen und Ionenpumpen [Kleinlogel et al., 2011b] (Abb. 4.27 a).

Als unterschiedliche Strategien wurden entweder ChRs mit besonders unterschiedlichen Anregungsmaxima - wie die rotlichtsensitiven ChRs ReaChR [Lin et al., 2013] oder Chrimson und die blaulichtaktivierten Anionenkanäle iC^{++} [Berndt et al., 2016] und *GtACR2* [Govorunova et al., 2015] - kombiniert oder Kombinationen von ChRs mit breiter spektraler Überlappung - wie Chrimson und die grünlichtaktivierten Anionenkanäle Aurora [Wietek et al., 2017] und *GtACR1* [Govorunova et al., 2015] - getestet (Abb. 4.27 b). Im ersten Fall kann aufgrund der guten spektralen Separation mit Licht von 600 nm fast ausschließlich das depolarisierende ChR (ReaChR oder Chrimson) aktiviert werden. Die gemessenen Umkehrpotentiale unterscheiden sich hierbei unabhängig vom fusionierten ACR kaum vom Umkehrpotential des einzeln exprimierten Protonen- oder Kationkanals (Abb. A.4 a und c) bzw. den mit der Nernst-Gleichung berechneten Gleichgewichtspotentialen eines H^+ - ($E_{rev} = 0$ mV) oder Na^+ -Stroms ($E_{rev} = 6$ mV). Im Vergleich zur einzelnen Expression ist jedoch die Photostromdichte von ReaChR und Chrimson im Fusionskonstrukt reduziert (Abb. 4.27 c). Interessanterweise ist die Photostromdichte von Chrimson in Fusionskonstrukten mit künstlichen Anionenkanälen (iC^{++} -Chrimson und Aurora-Chrimson) stärker reduziert als in Fusionskonstrukten mit natürlichen Anionenkanälen (*GtACR2*-Chrimson und *GtACR1*-Chrimson). Es scheint somit nicht die Fusionsstrategie *per se*, sondern vielmehr die Verträglichkeit der einzelnen Komponenten selbst für die Reduktion des Photostroms und vermutlich die schlechtere Membranexpression verantwortlich zu sein. Die Oligomerisierung der einzelnen Rhodopsine zwischen verschiedenen Fusionspaaren und eine daraus resultierende Bildung von Proteinnetzwerken könnte insbesondere für ChRs der selben Proteinfamilie ein Problem darstellen.

Bei Belichtung mit 490 nm - sowie für die Kombinationen von Chrimson mit Aurora oder *GtACR1* auch bei Belichtung mit 600 nm - werden sowohl das anionleitende ChR als auch das kation- bzw. protonenleitende ChR aktiviert (Abb. 4.27 b). Sowohl für das einzeln exprimierte ReaChR als auch für das einzeln exprimierte Chrimson beträgt der Photostrom nach Anregung mit 490 nm fast 60% des Photostroms bei 600 nm (Abb. A.4 a und b). Somit weichen die Umkehrpotentiale der Fusionskonstrukte bei Anregung mit 490 nm sowohl vom Umkehrpotential für Cl^- (~ -69 mV) als auch für H^+ und Na^+ ab (Abb. 4.27 d bis i). Die Abweichung variiert interessanterweise deutlich zwischen den einzelnen Fusionskonstrukten. Unter der Annahme, dass sich die Einzelkomponenten der Fusionskonstrukte gegenseitig weder in ihrer Öffnungswahrscheinlichkeit noch ihrer Leitfähigkeit beeinflussen, kann über das Umkehrpotential bei 490 nm die relative Leitfähigkeit der Fusionskonstrukte für Kation (Protonen eingeschlossen) und Anionen berechnet werden. Der Photostrom der Tandemkonstrukte bei einer Anregung mit 490 nm $I_{490nm}(V)$ ergibt sich mit der Spannung V , der Anzahl exprimierter Proteine n , der Öffnungswahrscheinlichkeit des kationleitenden CCRs $p_{O,CCR}$ und der des anionleitenden ACRs $p_{O,ACR}$ sowie der Einzelkanalleitfähigkeit

des kationleitenden CCRs γ_{K^+} und der des anionleitenden ACRs γ_{A^-} sowie den theoretischen mit der Nernst-Gleichung berechneten Umkehrpotentialen für Kationen E_{K^+} und Anionen E_{A^-} als:

$$I_{490nm}(V) = n \cdot [p_{O,CCR} \cdot \gamma_{K^+} \cdot (V - E_{K^+}) + p_{O,ACR} \cdot \gamma_{A^-} \cdot (V - E_{A^-})]$$

beim Umkehrpotential E_{rev} folgt:

$$0 = n \cdot [p_{O,CCR} \cdot \gamma_{K^+} \cdot (V - E_{K^+}) + p_{O,ACR} \cdot \gamma_{A^-} \cdot (V - E_{A^-})]$$

Für das Verhältnis der Einzelkanalleitfähigkeiten ergibt sich:

$$\frac{\gamma_{K^+}}{\gamma_{A^-}} = \frac{p_{O,ACR} \cdot (E_{A^-} - E_{rev})}{p_{O,CCR} \cdot (E_{rev} - E_{K^+})}$$

Unter der Annahme von $p_{O,CCR} = 0,6$ und $p_{O,ACR} = 1$ sowie unter Berücksichtigung der bei 490 nm gemessenen Umkehrpotentialen der einzeln exprimierten Kanäle E_{K^+} (Abb. A.4 a und c) sowie der Fusionskonstrukte E_{rev} folgt:

$$\begin{aligned} \frac{\gamma_{ReaChR}}{\gamma_{iC++}} &= 0,9 \\ \frac{\gamma_{Chrimson}}{\gamma_{iC++}} &= 3,7 \\ \frac{\gamma_{Chrimson}}{\gamma_{GtACR2}} &= 0,16 \end{aligned}$$

Hierin zeigt sich eine vierfach höhere Leitfähigkeit für Chrimson im Vergleich zu ReaChR und eine 23-fach höhere Leitfähigkeit von GtACR2 im Vergleich zu iC++. Letzteres bestätigt die bereits mittels Rauschanalyse bestimmte hohe Einzelkanalleitfähigkeit von GtACR2 (~ 600 fS [Govorunova et al., 2015]).

Die apparenten Aktionsspektren der Fusionskonstrukte unterscheiden sich schließlich von den Aktionsspektren aller bisher beschriebener ChRs (Abb. 4.27 j). Je nach Anregungswellenlänge können sowohl Einwärts- als auch Auswärtsströme ausgelöst werden. Ein vergleichbarer Lichtsensor ist in der Natur kaum zu erwarten, erlaubt jedoch in optogenetischen Experimenten die bidirektionale Kontrolle von Membranströmen. Die verbleibende Blaulichtsensitivität des rotverschobenen Chrimson oder ReaChR wird durch den entgegengesetzt gerichteten Anionstrom des fusionierten Anionkanals ausgeglichen und die spektrale Breite depolarisierender Wellenlängen begrenzt. Für jede Spannung kann schließlich jene Anregungswellenlänge bestimmt werden, bei der die Stromrichtung des Gesamtphotostroms sein Vorzeichen wechselt (λ_{rev}). Entsprechend der unterschiedlichen Photostrombeiträge der Einzelkomponenten zum Gesamtphotostrom unterscheiden sich die Umkehrwellenlängen zwischen den unterschiedlichen Konstrukten und zwischen verschiedenen Haltespannungen (Abb. 4.27 k). Spektrale Lage und dynamischer Spannungsbereich von λ_{rev} sind dagegen aufgrund der stöchiometrischen Expression der fusionierten ChRs für jedes Konstrukt gut reproduzierbar und variieren zwischen verschiedenen Zellen kaum. Während die Absorptionsma-

xima der Einzelkomponenten die spektrale Lage der Umkehrwellenlänge bestimmen, definieren die relativen Leitfähigkeiten der verwendeten Rhodopsine den dynamischen Spannungsbereich. Für *GtACR1*-Chrimson ändert sich λ_{rev} zwischen -40 mV und -60 mV um mehr als 40 nm und je nach Belichtungsfarbe könnte die Zellmembran eines Neurons auf eine bestimmte Spannung zwischen beiden Werten geklemmt werden.

4.6.2 Extrazelluläre pH-Wert-Änderung an der Membranoberfläche

Bei länger Aktivierung können lichtaktivierte Protonenpumpen den extrazellulären pH-Wert ändern. Insbesondere an der Membranoberfläche und in direkter Umgebung der Protonenpumpe könnte die pH-Wert-Änderung groß sein, wie sich durch einen speziell für HEK293-Zellen entwickelten, genetisch kodierten pH-Sensor testen lässt. Das pH-sensitive fluoreszente Protein pHluorinSE wurde hierfür C-terminal mit der β -Untereinheit der H^+/Na^+ -ATPase aus dem Rattenmagen fusioniert und an der Zellmembranoberfläche verankert, wo dessen Fluoreszenz durch extrazelluläre Protonen gebleicht werden konnte (Abb. 4.28 a).

Zur Bestimmung extrazellulärer pH-Wert-Änderung in unmittelbarer Nachbarschaft der Protonenpumpe wurde *CsR_{T46N}* direkt mit dem pH-Sensor β HK-pHluorin fusioniert (Abb. 4.28 b). Für membran-nahe pH-Wert-Messungen in größerer Entfernung zur Protonenpumpe wurde zwischen β HK-pHluorin und *CsR_{T46N}* eine virale P2A-Sequenz eingefügt, durch welche Protonenpumpe und pH-Sensor kotranslational getrennt wurden und separat in die Zellmembran gelangten [Szymczak-Workman et al., 2012]. Mit „Getrennt A“ (*CsR_{T46N}* - eCFP - P2A - β HK - pHluorin) und „Getrennt B“ (*CsR_{T46N}* - P2A - β HK - pluorin) wurden zwei verschiedene Konstrukte zur getrennten Expression getestet. Die Mutation T46N reduzierte die Spannungsabhängigkeit des *CsR* Pumpstroms [Vogt et al., 2015].

Die Membranlokalisation der pHluorin-Fluoreszenz in HEK293-Zellen war auch im Fusionskonstrukt von β HK-pHluorin und *CsR_{T46N}* hervorragend (Abb. 4.28 c). Die Bestimmung der extrazellulären pH-Wert-Änderung erfolgte in einem Doppelbelichtungsexperiment. Der pH-Sensor pHluorin wurde mit 5 ms-Lichtpulsen bei 490 nm in einer Frequenz von 2 Hz angeregt und gleichzeitig die Protonenpumpe *CsR_{T46N}* für 15 s mit 550 nm-Licht aktiviert. Zum Ende der Messung wurde durch einen manuellen Lösungsaustausch der extrazelluläre pH-Wert auf pH_e 9,0 angehoben und anschließend auf pH_e 5,0 abgesenkt, um eine Normierung der gemessenen Fluoreszenzwerte zu ermöglichen (Abb. 4.28 d)². Aus den gemessenen Fluoreszenzwerten konnte anschließend mit Hilfe der β HK-pHluorin-Kalibrierung (siehe Abschnitt 3.4.2) der extrazelluläre pH-Wert an der Membranoberfläche berechnet werden (Abb. 4.28 e).

In allen die Protonenpumpe *CsR_{T46N}* exprimierenden Konstrukten führte die Aktivierung mit 550 nm-Licht zu einer Ansäuerung der extrazellulären Membranoberfläche (Abb. 4.28 f). Die größten pH-Wert-Änderungen wurden für das *CsR_{T46N}*- β HK-pHluorin-Fusionskonstrukt und entsprechend in direkter Nachbarschaft der Protonenpumpe beobachtet. Eine große Zellvariabilität

²Messungen mit einer bei pH_e 5,0 normierten Fluoreszenz größer als 0,2 wurden verworfen. Eine verringerte Sensitivität der pHluorin-Fluoreszenz bezüglich des extrazellulären pH-Wertes wurde hierbei als Indikator für einen erhöhten Beitrag intrazellulärer pHluorin-Fluoreszenz zur Gesamtfluoreszenz der Zelle gedeutet. Intrazelluläre pH-Wert-Änderung sollten jedoch nicht untersucht werden.

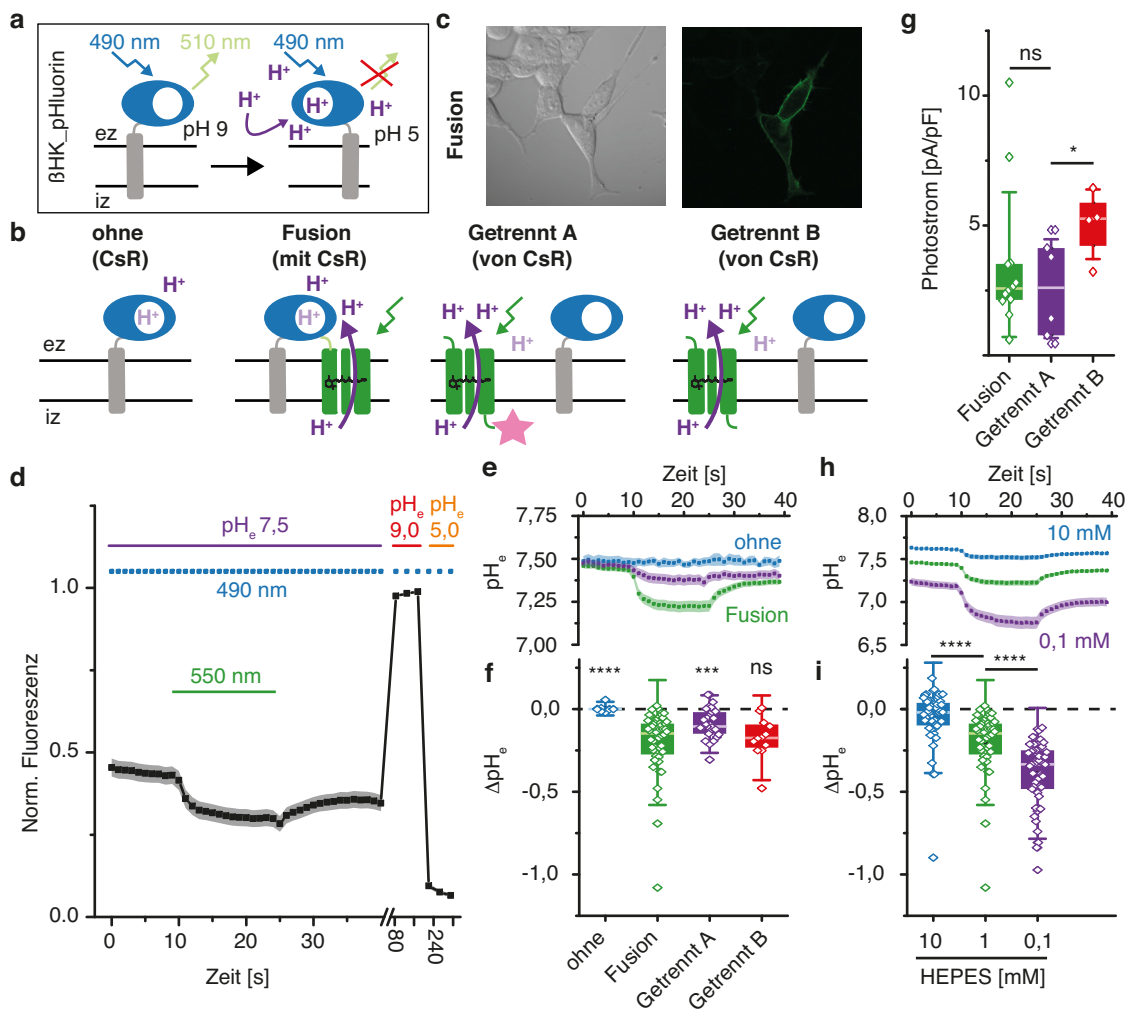


Abbildung 4.28: Lokale pH-Wert-Messungen an der Zelloberfläche (a) BHK-pHluorin fluoresziert nach 490-nm-Anregung bei 510 nm und die Fluoreszenz wird durch H^+ gelöscht. (b) Verwendete Konstrukte abgekürzt als „ohne“ (BHK-pHluorin), „Fusion“ (BHK-pHluorin- CsR_{T46N}), „Getrennt A“ (CsR_{T46N} -eCFP-P2A-BHK-pHluorin) und „Getrennt B“ (CsR_{T46N} -P2A-BHK-pHluorin) mit der β -Untereinheit der H^+/Na^+ -ATPase als Membrananker (grau), supereklipischem pHluorin (blau), eCFP (pink) und der Protonenpumpe CsR_{T46N} (grün). (c) Konfokale Durchlicht- und Fluoreszenzaufnahmen von „Fusion“ in HEK293-Zellen angeregt bei 490 nm. (d) Exemplarische Messkurve in HEK293-Zellen: „Fusion“ wurde für 15 s bei 560 nm aktiviert und gleichzeitig die pHluorin-Fluoreszenz gemessen und auf die maximale Fluoreszenz bei pH_e 9,0 normiert ($n=25$). (e und f) Gemittelte extrazelluläre pH_e -Wert-Änderung bei Aktivierung mit 560 nm in 1 mM HEPES mit „ohne“ (blau), „Fusion“ (grün), „Getrennt A“ (lila) und „Getrennt B“ (rot) gemessen wie in (d) und berechnet nach Abb. 3.2 ($n=10-35$). (g) Gemittelte stationäre Photostromdichten bei 0 mV. (h und i) Gemittelte pH_e -Änderung bei Aktivierung mit 560 nm von „Fusion“ in 10 mM HEPES (blau), 1 mM HEPES (grün) und 0,1 mM HEPES (lila) gemessen wie in (d) und berechnet nach Abb. 3.2 ($n=10-35$). (d), (e) und (h) zeigen $M \pm SE$ und (f), (g) und (i) $M \pm SD$.

der extrazellulären pH-Wert-Änderung deutet hierbei auf einen starken Einfluss variabler Zellparameter wie Zellgröße, Form und Expressionsdichte der Protonenpumpe hin. Für das CsR_{T46N} -BHK-pHluorin-Fusionskonstrukt („Fusion“) und das Protonenpumpe und pH-Sensor getrennt exprimierende „Konstrukt A“ war die mittlere Photostromdichte vergleichbar hoch (Abb. 4.28 g) und nicht eine höhere Expression, sondern die räumliche Nähe von Protonenpumpe und pH-Sensor könnte die im Mittel größeren Fluoreszenzänderungen des Fusionskonstruktes erklären. Beson-

ders wichtig für die extrazelluläre pH-Wert-Änderung war schließlich auch direkt an der Membranoberfläche die Konzentration des extrazellulären pH-Puffers (Abb. 4.28 h). Entsprechend waren pH-Wert-Änderungen insbesondere bei niedriger HEPES-Konzentration (0,1 mM HEPES) groß ($\sim 0,4 \pm 0,2$ pH-Einheiten), wohingegen mit 10 mM extrazellulärem HEPES nur noch in einzelnen Zellen größere pH-Wert-Änderungen beobachtet werden konnten (Abb. 4.28 i).

4.6.3 Protonengekoppelte Zwei-Komponenten-Optogenetik

Protonenaktivierten Ionenkanäle könnten direkt durch lichtinduzierte lokale pH-Wert-Änderungen aktiviert werden. Als lokale Protonenquelle könnte die sowohl in *Xenopus laevis* Oozyten als auch in HEK293-Zellen gut exprimierte Protonenpumpe CsR_{T46N} verwendet werden (Abb. 4.29 a). Die trimere Asic-Kanäle aus Ratten [Waldmann et al., 1997] oder der pentamere Glic-Kanal aus *Gloeobacter violaceus* [Bocquet et al., 2007] leiten ausschließlich Kationen und übertreffen ChRs in ihrer Einzelkanalleitfähigkeit um Größenordnungen (z.B. 18,5 pS für Asic2a [Zhang and Canessa, 2002] verglichen mit 41,5 fS für CrChR2 [Feldbauer et al., 2009]). Die pH-Sensitivität des Glic-Kanals kann durch die Mutation A13'T (abgekürzt als GlicT) erhöht werden und eine Aktivierung auch bei geringeren lokalen pH-Änderungen fördern [Tillman et al., 2012]. Der protonenaktivierte Glic-Kanal teilt weiterhin eine gemeinsame molekulare Architektur mit anderen pentameren ligandenaktivierten Ionenkanälen. In der Chimäre GlicGlyR konnte entsprechend die extrazelluläre Domäne des Glic-Kanals mit der Transmembrandomäne des chloridleitenden GlyR-Kanals zu einem protonenaktivierten Chloridkanal fusioniert werden [Duret et al., 2011].

Zur lichtgesteuerten Aktivierung der protonenaktivierten Kanäle wurden diese zusammen mit der Protonenpumpe CsR_{T46N} in einem Verhältnis von jeweils 1:1 in *Xenopus laevis* Oozyten koexprimiert (pH_e 7,5/8,0. Abb. 4.29 b bis f). Bei Belichtung mit 560 nm konnte für alle Kombinationen ein auffällig multiphasischer Photostrom beobachtet werden. Ein initialer, unter allen Spannungen auswärtsgerichteter Photostrom ist auf den Protonentransport von CsR zurückzuführen (Abb. 4.29 b Einschub) und wird gefolgt von einem deutlich größeren sekundären Photostrom des koexprimierten Kanals, welcher je nach angelegter Spannung seine Stromrichtung ändert. Für Kombinationen mit Asic1a und Asic3 inaktiviert der sekundäre Photostrom nach wenigen Sekunden vollständig und nur der initiale Pumpstrom verbleibt (Abb. 4.29 b und d). Für Kombinationen mit Asic2a, GlicT und GlicGlyR ist hingegen eine anhaltende Aktivierung des koexprimierten Kanals zu beobachten (Abb. 4.29 c, e und f).

Ein Austausch der extrazellulären Messlösung durch Puffer unterschiedlicher Kation- oder Anionenzusammensetzung erlaubte es, die Ionenselektivität der komplexen Photoströme zu bestimmen (Abb. 4.29 g bis i). Während für „ $CsR_{T46N} + GlicT$ “ der Austausch von Na^+ durch K^+ den Photostrom kaum verändert, führt der gleiche Austausch für „ $CsR_{T46N} + Asic2a$ “ zu einer deutlichen Reduktion des Einwärtsstroms und zu einer Verschiebung des Umkehrpotentials um 36 ± 3 mV. Der lichtaktivierte GlicT selektiert entsprechend nicht zwischen verschiedenen monovalenten Kationen, wohingegen die Kombination von CsR_{T46N} und Asic2a einen lichtaktivierten Natriumkanal darstellt. Sowohl für Asic2a als auch GlicT führt der Austausch von Na^+ durch das wesentlich größere organische Kation Cholin zu einem vollständigen Verschwinden der Einwärtsströme und ei-

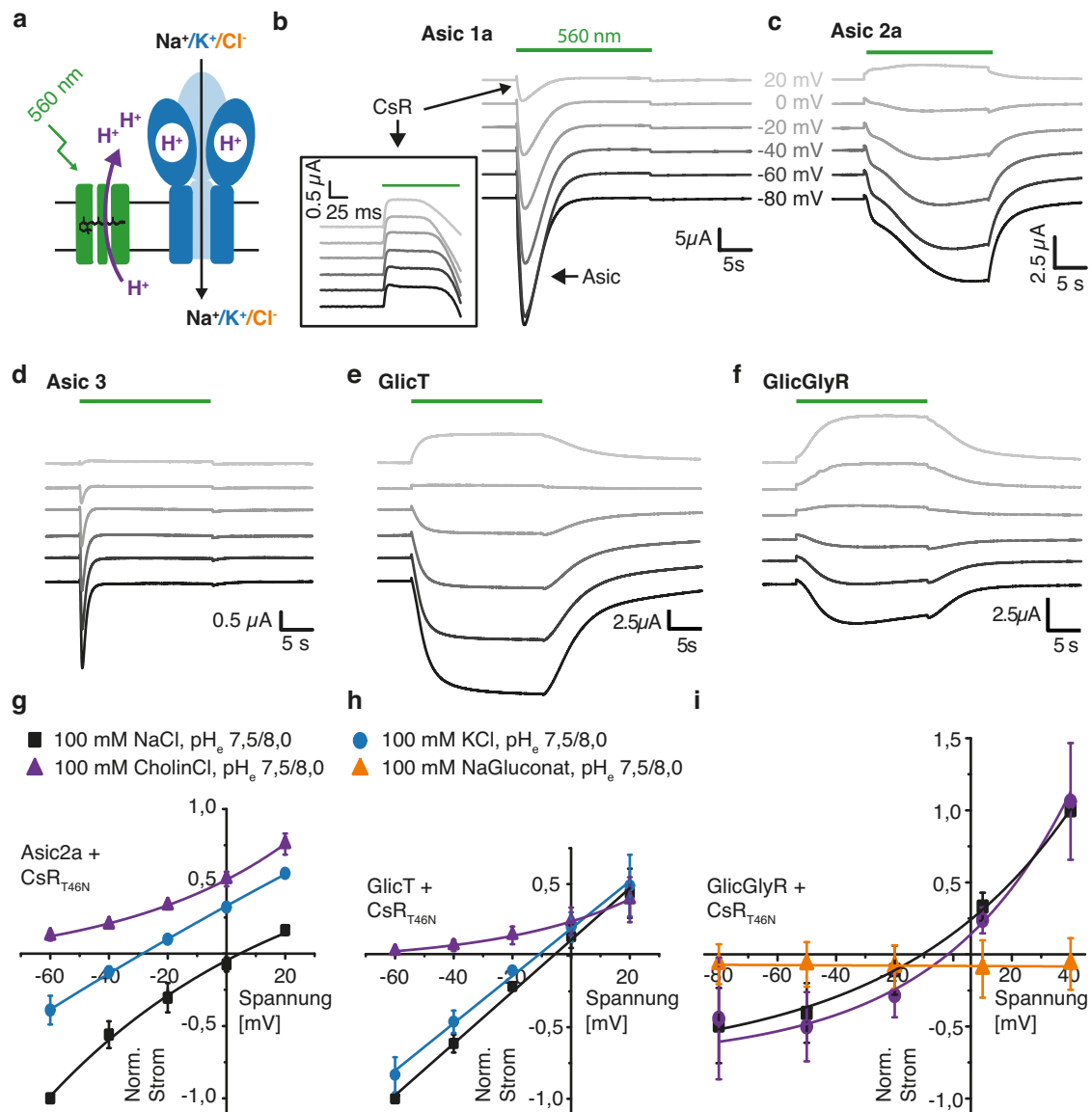


Abbildung 4.29: Protonengekoppelte Zwei-Komponenten-Optogenetik (a) Schematische Darstellung der lichtgetriebenen Protonenpumpe CsR_{T46N} (grün) und eines H^+ -aktivierten Ionenkanals (blau). Aktivierung von CsR_{T46N} mit 560 nm Licht induziert eine extrazelluläre Ansäuerung und öffnet den Kation-, Natrium- oder Chloridkanal. (b-f) Repräsentative Photoströme von CsR_{T46N} , koexprimiert in *Xenopus laevis* Oozyten im Verhältnis von 1:1 mit Asic1a (b), 1:1 mit Asic2a (c), 2:1 mit Asic3 (d), 1:1 mit GlicT (Glic A13'T [Tillman et al., 2012]) (e) und 1:1 mit GlicGlyR [Duret et al., 2011] (f) in 100 mM NaCl, 0,1 mM MOPS und pH_e 7,5/8,0 unter konstanter Perfusion des Messpuffers. Einschub: Vergrößerung des initialen CsR -Pumpstroms. (g-h) Strom-Spannungskurven normalisierter Peakphotoströme von CsR_{T46N} und Asic2a (n=4) (g), CsR_{T46N} und GlicT (n=4) (h) und CsR_{T46N} und GlicGlyR (n=3) (i) entsprechend (c), (e) und (f) in verschiedenen extrazellulären Lösungen unterschiedlicher Ionenzusammensetzung mit 0,1 mM MOPS und pH_e 7,5/8,0. Alle Messungen zeigen $M \pm$ SD.

ner Verschiebung des Umkehrpotentials zu Werten außerhalb des gemessenen Spannungsbereichs. Anders als in ChRs werden somit Protonen bei neutralem pH nicht passiv geleitet. Für „GlicGlyR und CsR_{T46N} “ konnten schließlich nur minimale Photostromänderungen nach Substitution von Na^+ durch Cholin $^+$ beobachtet werden, wohingegen Auswärtsströme (bzw. Anioneninwärtsströme)

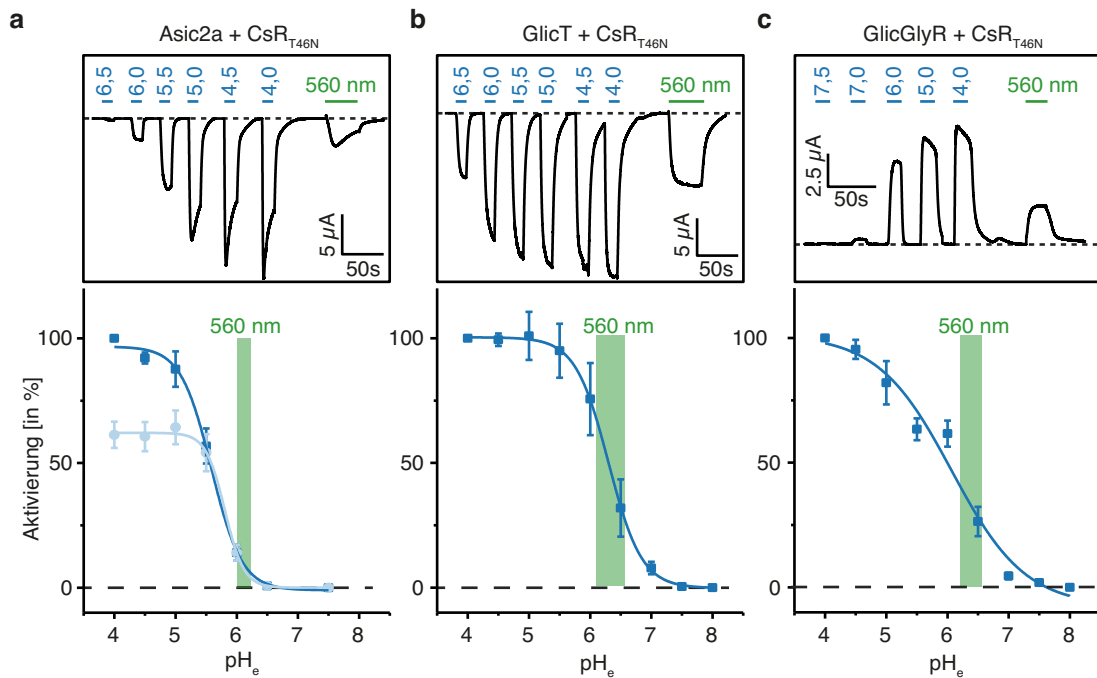


Abbildung 4.30: pH und Lichtaktivierung der Zwei-Komponenten-Systeme (a) Oben: Repräsentative Photoströme der pH-Titration von „CsR_{T46N} + Asic 2a“ und anschließende Lichtaktivierung mit 560 nm in 0,1 mM MOPS bei pH_e 7,5 und –40 mV. Unten: Normalisierte Asic2a-Ströme bei verschiedenen pH_e im Maximum (dunkelblau) oder zum Ende des pH-Pulses (hellblau). Der grüne Balken umschließt den durch CsR-Aktivierung eingestellten extrazellulären pH-Wert, dessen Breite nach der Standardabweichung der mittleren Lichtaktivierung berechnet wurde (n=6-8). (b) „CsR_{T46N} + GlicT“ wie (a) mit pH_e 8,0 zwischen den pH-Pulsen und während der Lichtaktivierung (n=5-12). (c) „CsR_{T46N} + GlicGlyR“ wie (b) bei 0 mV (n=5-8). Alle Messungen zeigen M ± SD.

nach Substitution von Cl⁻ durch das organische Anion Gluconat⁻ komplett verschwanden und eine lichtaktivierte Chloridleitung bestätigen. Die Kombination von „GlicGlyR und CsR_{T46N}“ repräsentierte damit bereits im Herbst 2013³ vor der Beschreibung artifizieller [Berndt et al., 2014, Wietek et al., 2014] und natürlicher anionenleitender ChRs [Govorunova et al., 2015] einen lichtaktivierten Chloridkanal hoher Anionenleitfähigkeit.

Passive Ströme aller präsentierten Zwei-Komponenten-Systeme lassen sich aufgrund der verwendeten Architektur sowohl durch Licht als auch durch transiente pH-Wert-Änderungen auslösen. Eine pH-Titration der Zwei-Komponenten-Systeme erlaubte es bei anschließender Lichtaktivierung, den Anteil der in der Oozyte durch CsR_{T46N} aktivierten Kanäle zu quantifizieren (Abb. 4.30 a bis c). Aufgrund der unterschiedlichen Dosis-Wirkungskurven der verwendeten Kanäle unterscheidet sich dieser Anteil zwischen den verschiedenen Konstrukten⁴. Entsprechend können bei längerer Belichtung mit grünem Licht für „CsR_{T46N} + Asic2a“ $9 \pm 4\%$, für „CsR_{T46N} + GlicT“ $46 \pm 20\%$ und für „CsR_{T46N} + GlicGlyR“ $33 \pm 6\%$ der Kanäle geöffnet werden. Durch einen Vergleich der relativen Aktivierung mit der Dosis-Wirkungskurve der koexprimierten Ionenkanäle kann die extrazelluläre Ansäuerung der Oozytenoberfläche berechnet werden. Bei 0,1 mM MOPS

³Präsentiert auf der Ringberg-Konferenz „Rundgespräche: Photoreceptors“ am 23^{ten} September 2013.

⁴Eine halbmaximale Aktivierung wird bei pH-Werten von $ED_{50} = 5,6$ für Asic2a, $ED_{50} = 6,3$ für GlicT und $ED_{50} = 6,1$ für GlicGlyR erreicht.

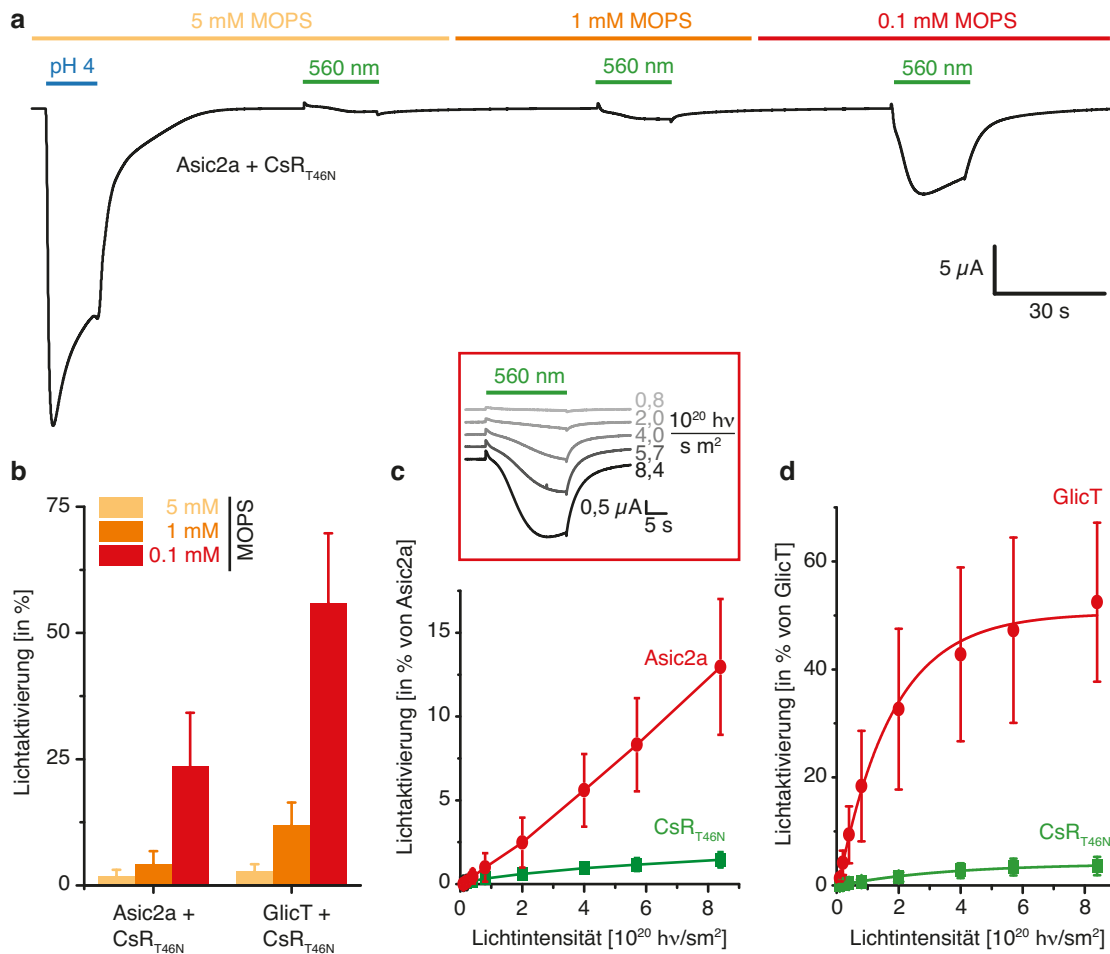


Abbildung 4.31: Zwei-Komponenten-Konstrukte bei verschiedener Pufferkapazität und Lichtintensität (a) Repräsentative Strommessung von „CsR_{T46N} und Asic2a“ in *Xenopus laevis* Oozyten bei unterschiedlicher extrazellulärer Pufferkapazität und pH_e 7,5 sowie –40 mV (b) Mittlere Lichtaktivierung des koexprimierten Kanals entsprechend (a) (M ± SD; n=6-9). (c) Aktivierung des einwärtsgerichteten Asic2a-Stroms sowie des initialen auswärtsgerichteten CsR_{T46N}-Stroms bei verschiedenen 560 nm Belichtungsintensitäten in 0,1 mM MOPS (M ± SD; n=5-6; normalisiert auf die pH-Aktivierung des Asic2a Kanals). Einschub: Repräsentative Photoströme von „CsR_{T46N} und Asic2a“ bei verschiedener Belichtungsintensität. (d) Lichttitration von CsR_{T46N} und GlicT wie (c) (n=6-7).

ergibt sich ein Oberflächen-pH_e von 6,1 - 6,6 mit guter Übereinstimmung für alle drei getesteten Konstrukte⁵. Trotz kontinuierlicher Perfusion ist die extrazelluläre Ansäuerung in Oozyten somit stärker als in HEK293 Zellen, wo ein oberflächennaher pH_e von 7,1 ± 0,2 in 0,1 mM HEPES erreicht wurde (siehe Abb. 4.28).

Die Öffnung des protonenaktivierten Ionenkanals durch CsR_{T46N} ist auch in Oozyten abhängig von der extrazellulären Pufferkapazität (Abb. 4.31 a). Bei einer Erhöhung der extrazellulären MOPS-Konzentration von 0,1 mM auf 5 mM wird die Öffnung des Kanals um einen Faktor von 13-20 reduziert (Abb. 4.31 b). Mit Hilfe der Dosis-Wirkungskurve der verwendeten Kanäle kann erneut aus der Aktivierung des Kanals auf die extrazelluläre Ansäuerung an der Oozytenober-

⁵Der berechnete extrazelluläre pH-Wert nach CsR_{T46N} Aktivierung beträgt für „CsR_{T46N} + Asic2a“ pH 6,05 bis pH 6,26, für „CsR_{T46N} + GlicT“ pH 6,1 - pH 6,6 und für „CsR_{T46N} + GlicGlyR“ pH 6,2 - pH 6,5.

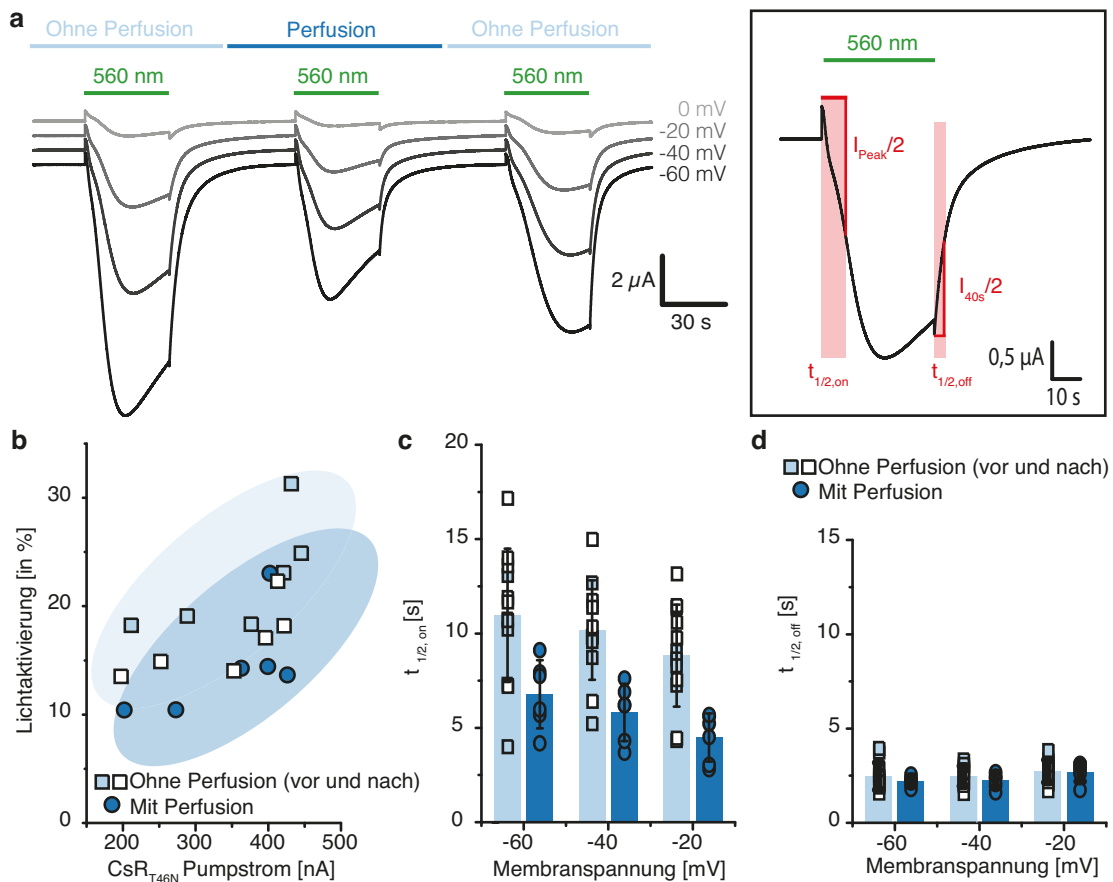


Abbildung 4.32: Lichtaktivierung eines Zwei-Komponenten-Systems mit und ohne extrazellulären Lösungsaustausch (a) Repräsentative Photoströme bei wiederholter Belichtung mit 560 nm in 0,1 mM MOPS mit und ohne kontinuierlichen Austausch der extrazellulären Lösung in einer Geschwindigkeit von 1,2 ml/min und einer Messkammergröße von 300 μ l. (b) Relative Aktivierung von Asic2a in Abhängigkeit von der Größe des initialen Pumpstroms. (c) Dauer der halbmaximalen Aktivierung des Asic2a-Photoströms mit und ohne kontinuierliche Perfusion der extrazellulären Lösung ($M \pm SD$). (d) Dauer der halbmaximalen Kanalschließung mit und ohne kontinuierliche Perfusion der extrazellulären Lösung ($M \pm SD$).

fläche geschlossen werden. Eine Aktivierung von 8-16% der GlicT-Kanäle in 1 mM MOPS entspricht hierbei einem pH-Wert von 6,7-7,0 und eine Aktivierung von 2-4% der Kanäle in 5 mM MOPS einem pH-Wert von 7,1-7,4 an der Oozytenoberfläche. Überraschenderweise werden auch für „CsR_{T46N} + Asic2a“ in 1 mM MOPS noch 2-7% der Asic2a Kanäle durch Licht geöffnet (Abb. 4.31 b), obwohl entsprechend der pH-Titration des Asic2a Kanals bei pH 6,7 (berechnet anhand der Aktivierung vom „CsR_{T46N} + GlicT“) weniger als 1% der Kanäle geöffnet vorliegen sollten (Abb. 4.30 a). Als mögliche Erklärung könnten im Gegensatz zu äußeren pH-Änderung durch CsR lichtinduzierte pH-Wert-Änderungen an der Membranoberfläche lokal größer ausfallen oder Protonen effizienter von der lichtgetriebenen Pumpe an die pH-sensitive Domäne des Kanals weitergeleitet werden und eine effizientere Kanalaktivierung ermöglichen.

Bei zunehmender Lichtintensität nimmt der initiale Pumpstrom zu (Abb. 4.31 c und d). Die resultierende stärkere extrazelluläre Ansäuerung führt zu einer stärkeren Aktivierung des koexprimierten Ionenkanals. Interessanterweise scheint die Aktivierung von „CsR_{T46N} + GlicT“ bei hö-

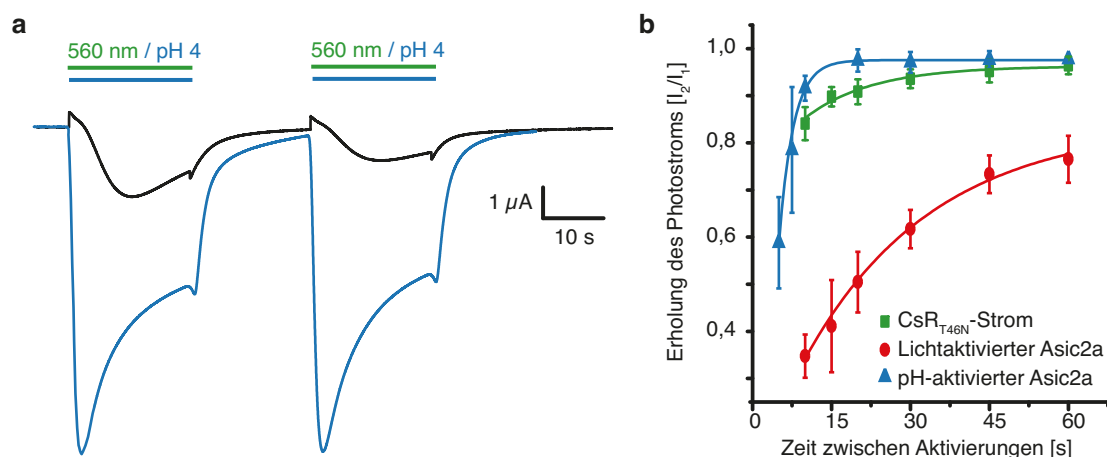


Abbildung 4.33: Photostromerholung nach Lichtaktivierung von Asic2a (a) Repräsentative Photoströme bei wiederholter Aktivierung von Asic2a und CsR_{T46N} durch transiente Ansäuerung auf pH_e 4,0 oder 20-sekündige Belichtung mit 560 nm in 0,1 mM MOPS. (b) Erholung des pH- oder lichtaktivierten Stroms entsprechend (a) mit variabler Zeit zwischen den Aktivierungspulsen (M ± SD; n=5-6).

heren Lichtintensitäten zu sättigen (Abb. 4.31 d) während sie für „CsR_{T46N} + Asic2a“ auch bei hohen Photonendichten weiterhin zunimmt (Abb. 4.31 c). Während der Pumpstrom auch bei hohen Lichtintensitäten in beiden Konstrukten weiterhin stieg, könnte die unterschiedliche Form der Dosis-Wirkungskurve des Kanals im erreichten pH-Bereich die unterschiedlichen Lichttitrationskurven beider Kanäle erklären. Entsprechend sind die GlicT-Kanäle aufgrund des verschobenen pH-sensitiven dynamischen Bereichs bereits bei niedriger Protonenkonzentration mit höherer Wahrscheinlichkeit geöffnet als die Asic2a Kanäle (Abb. 4.30 a und b).

Die extrazellulären pH-Wert-Änderungen scheinen schließlich lokal auf die Oozytenoberfläche begrenzt zu sein und Photostromamplituden von „CsR_{T46N} + Asic2a“ sind auch bei einem kontinuierlichen Austausch der Messkammerlösung nur geringfügig kleiner als ohne Messkammerperfusion (Abb. 4.32 a). Die Kanalaktivierung korreliert erneut mit der Größe des CsR_{T46N}-Stroms (Abb. 4.32 b) und erfolgt schneller bei kontinuierlichem Lösungsaustausch (Abb. 4.32 c). Die Geschwindigkeit des Kanalschließens ist hingegen unabhängig von der Badperfusion und Protonen scheinen nach Ausschalten des Lichtes schnell von der Membran zu dissoziieren (Abb. 4.32 d). Bei wiederholter Aktivierung von „CsR_{T46N} + Asic2a“ nehmen Einwärtsströme ab und erholen sich für die Aktivierung mit Licht deutlich langsamer als im Fall einer pH-Aktivierung (Abb. 4.33 a und b). Wohingegen die Diffusion von Protonen weg von der Membran unmittelbar nach Ausschalten des Lichtes auch in schwach gepufferter Lösung schnell zu erfolgen scheint, könnte die vollständige Rückkehr zum Ausgangs-pH-Wert nur sehr langsam sein und die Asic2a-Kanäle länger in einem inaktivierten Zustand halten.

Zusammenfassend kann bestätigt werden, dass lichtinduzierte pH-Wert-Änderungen zur Aktivierung sekundärer Ionenkanäle verwendet werden können. Photoströme der Zwei-Komponenten-System können sich je nach verwendeten Ionenkanal in ihrer Amplitude und Ionenselektivität von ChRs unterscheiden und sind für optogenetische Anwendung interessant. Für eine effiziente Aktivierung des Kanals ist eine schwach gepufferte Umgebung und eine hohe Expression der Pro-

tonenpumpe von Vorteil. Auch die räumliche Nähe von Protonpumpe und Ionenkanal fördert die effiziente Kopplung vom Lichtsensor zum Photostromeffektor durch Protonen.

5 DISKUSSION

Protonenleitende und transportierende mikrobielle Rhodopsin dienen in der Natur der Lichtwahrnehmung und Energiegewinnung und können wissenschaftlich genutzt werden, um als optogenetische Werkzeuge komplexe biologische Fragestellung zu beantworten [Zhang et al., 2011]. Die Entdeckung neuer ChRs offenbarte in den letzten Jahren eine faszinierende funktionale und strukturelle Vielfalt von großem optogenetischen Potential und eröffnet neue mechanistische Perspektiven [Govorunova et al., 2017a]. Das rotlichtaktivierte Chrimson unterscheidet sich aufgrund seiner Farbabsorption, der effizienten Protonenleitung und des polychromen Photozyklus von bisher untersuchten Kanälen und konnte als erstes protonenselektives ChR strukturell biologisch aufgeklärt werden [Oda et al., 2018]. Basierend auf den sich ergänzenden elektrophysiologischen Messungen dieser Arbeit an Chrimson, *CrChR2*, dem Protonenkanal *CsChR*, der Protonenpumpe *CsR* sowie unterschiedlichen Zwei-Komponenten-Systemen können im folgenden die molekularen Grundlagen der Rotlichtabsorption, Lichtadaptation, Protonenleitung, Photostromkinetik und Pumpkanaldualität von ChRs diskutiert sowie neue optogenetische Strategien zur Anpassung der Ionenselektivität und spezifischen Rotlichtanregung betrachtet werden.

5.1 Molekulare Bestimmungsfaktoren der Rotlichtabsorption von Chrimson

Chrimson ist mit einer maximalen Farbabsorption von 585 nm um 20 nm weiter rotverschoben als das Iodopsin im Rotlichtrezeptor des menschlichen Auges [Neitz et al., 1991]. Eine weitere Rotverschiebung jenseits von 600 nm konnte in dieser Arbeit unter Erhaltung der Kanalfunktion durch eine einzelne Punktmutation zwischen Retinalbindetasche und Gegenionkomplex erzielt werden. Gleichzeitig wurden die molekularen Bestimmungsfaktoren der Rotlichtabsorption von Chrimson bestimmt, welche im Folgenden anhand der verfügbaren Kanalrhodopsindunkelstrukturen mit Absorptionsmaxima von 455 nm [Kato et al., 2015b] bis 585 nm [Oda et al., 2018] diskutiert werden können (Abb. 5.1). Entsprechend der Farbverschiebung untersuchter Chrimsonmutanten sind sowohl der Gegenionkomplex als auch Seitengruppen der äußeren Pore und der Retinalbindetasche für die Rotlichtabsorption von Chrimson von Bedeutung.

5.1.1 Struktur und Protonierung des Gegenionkomplexes

Die größte Bedeutung für die Rotlichtabsorption von Chrimson kommt dessen Gegenionkonfiguration zu mit Farbverschiebungen einzelner Gegenionmutanten von über 60 nm. Nur kleine Farbverschiebungen bei neutraler Substitution des C11 sowie große hypsochrome Absorptionsänderun-

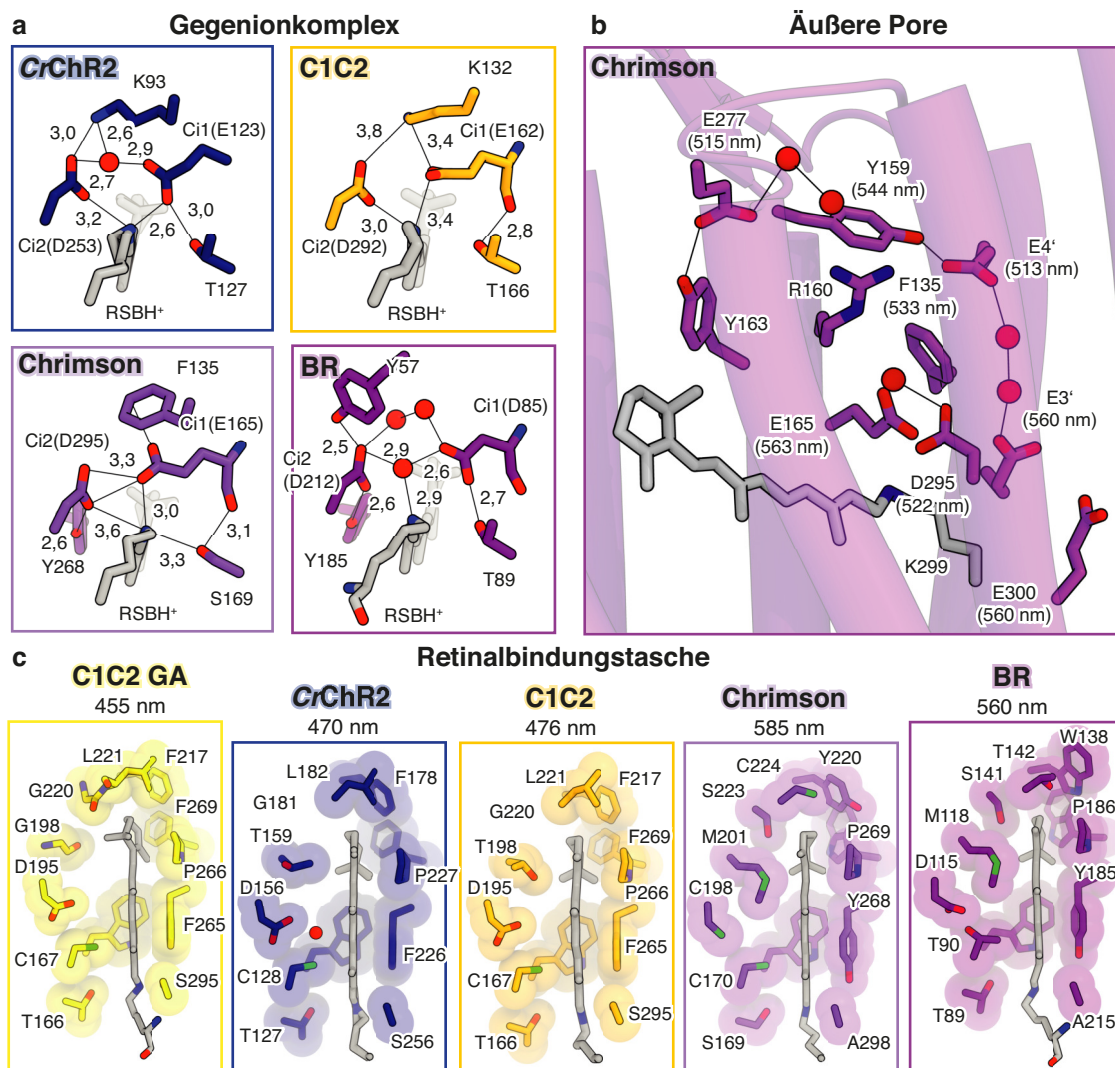


Abbildung 5.1: Molekulare Bestimmungsfaktoren der Farbabsorption verschiedener ChRs Ausschnitte der ChR-Dunkelstrukturen von C1C2 (PDB: 3ug9) [Kato et al., 2012], C1C2 GA (abgekürzt für T198G G202A) (PDB: 4yzi) [Kato et al., 2015b], CrChR2 (PDB: 6eid) [Volkov et al., 2017] und Chrimson (PDB: 5zih) [Oda et al., 2018] sowie der lichtadaptierten Dunkelstruktur von BR (PDB: 1c3w) [Luecke et al., 1999b]. **(a)** Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerk des Gegenionkomplexes. Die Länge der jeweiligen Wasserstoffbrücken ist in Å angegeben. **(b)** Übersicht für die Farbabsorption relevanter Aminosäuren der äußeren Pore von Chrimson. In Klammern sind die Anregungsmaxima nach Substitution der entsprechenden Seitengruppe durch ein Alanin angegeben (entsprechend Tabelle A.3). Für K299 und Y163 wurden keine Mutationen getestet. Die R162A-Mutante zeigt keine Photoströme und R162H konnte maximal bei 553 nm angeregt werden. **(c)** Querschnitt der Retinalbindetasche betrachtet von zytoplasmatischer Seite.

gen nach Mutation des benachbarten F135 in Helix 2 sowie des zweiten Gegenions Ci2 in Helix 7, können durch ein im WT protoniertes Ci1 erklärt werden, dessen Protonierung durch das Ci2 und F135 stabilisiert wird. Aufgrund des protonierten Ci1, stellt das weiterhin deprotonierte Ci2 das einzige Gegenion in Chrimson dar. Eine vergleichbare Gegenionkonfiguration wurde auch für CaChR1 diskutiert [Li et al., 2014a] und konnte sowohl in CaChR1 als auch in Chrimson durch pH-Titrationskurven des aufgereinigten WT-Proteins und einer neutral substituierten Ci1-Mutante

bestätigt werden [Urmann et al., 2017].

Während in *CrChR2* und *PsChR2* der apparente pK_a -Wert des Ci1 durch ein Lysin in Helix 2 abgesenkt wird [Li et al., 2014a], ist in Chrimson nicht das Fehlen des positiv geladenen Lysins - wie ursprünglich für *CaChR1* diskutiert wurde [Li et al., 2014a] -, sondern der aromatische Charakter von F135 selbst für die Protonierung des Ci1 verantwortlich. Die Protonierung des Ci1 könnte hierbei direkt elektrostatisch durch die spezifische Ausrichtung des π -Elektronensystems von F135 begünstigt werden [Philip et al., 2011]. Zusätzlich befindet sich das protonierte Ci1 an nahezu deckungsgleicher Position wie das Wasser W402 in BR und scheint über eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem deprotonierten Ci2 in Helix 7 zu interagieren, welches zur Vermeidung einer Coulombschen Abstoßung beider Gegenionreste [Harris and Turner, 2002] den pK_a -Wert des Ci1 anzuheben scheint.

Auch für C1C2 wurde eine Protonierung des Ci1 diskutiert [Kato et al., 2012]. Die fehlende negative Ladung des Ci1 führt jedoch weder in C1C2 noch in Ci1-Mutanten von *CrChR2* [Gunaydin et al., 2010], C1V1 [Yizhar et al., 2011] oder ReaChR [Kaufmann et al., 2017, Rajasethupathy et al., 2015] zu einer zu Chrimson vergleichbaren Rotverschiebung der Proteinabsorption. Zusätzlich zur Protonierung des Ci1 ist entsprechend auch der strukturelle Aufbau des Gegenionkomplexes für die Rotlichtabsorption von Chrimson von Bedeutung (Abb. 5.1 a). Während das protonierte Ci1 in Chrimson nur 3,0 Å von der RSBH⁺ entfernt ist, befindet sich das negativ geladene Gegenion Ci2 mit 3,6 Å deutlich weiter von der RSBH⁺ entfernt als die Gegenionreste in *CrChR2* (2,6 Å (Ci1) und 3,2 Å (Ci2)) oder C1C2 (3,4 Å (Ci1) und 3,0 Å (Ci2)). Mitunter könnte das Ci2 in Chrimson die RSBH⁺ sogar nur indirekt über die protonierte Carbonylgruppe des Ci1 stabilisieren (Abb. 5.1 a). In Position gehalten wird das Ci2 in Chrimson durch Wasserstoffbrückenbindungen mit Y268 in Helix 6 und vermutlich auch dem Ci1 in Helix 3. Die direkte Wasserstoffbrückenbindung zwischen beiden Gegenionresten hätte somit eine Doppelfunktion und scheint gleichzeitig den pK_a -Wert des Ci1 anzuheben und das Ci2 zu positionieren. Entsprechend der besonderen Bedeutung der Ci2-Ausrichtung führen sowohl Substitution von Y268 als auch von Ci1 zu einer Blauverschiebung der Proteinabsorption, wobei die Farbverschiebung der Ci1-Mutanten wesentlich von der eingefügten Aminosäure abhängt.

In den protonenleitenden Kanalrhodopsinen *DsChR1* und *CsChR* befindet sich mit einem Histidin (H130 in *CsChR*) eine dritte Art von Aminosäure an der Position von K93 (*CrChR2*) und F135 (Chrimson) und somit in direkter Nachbarschaft des Gegenionkomplexes. Auch in eubakteriellen Protonenpumpen wie Proteorhodopsin oder ESR aus *Exiguobacterium sibiricum* findet sich ein Histidin in Helix 2, welches direkt mit dem deprotoniertem Ci1 interagiert [Gushchin et al., 2013, Hempelmann et al., 2011], dessen Farbabsorption und Photozykluskinetik beeinflusst [Bergo et al., 2009, Petrovskaya et al., 2015] und zumindest in Proteorhodopsin auch aktiv am Protonentransfer beteiligt zu sein scheint [Bergo et al., 2009]. In *CsChR* führt die Substitution der möglicherweise ebenfalls mit dem Gegenion interagierenden Histidinseitengruppe (H130A) zu einer hypsochromen Farbverschiebung der Proteinaktivität. Genau wie F135 in Chrimson könnte entsprechend auch H130 in *CsChR* den pK_a des Ci1 anheben und dessen Protonierung fördern. Alternativ wäre jedoch auch eine Wechselwirkung von H130 mit dem benachbarten E3' in Helix 2 denkbar, welches insbesondere in *CsChR* unabdingbar für eine effiziente Protonenleitung ist und auch in

Chrimson [Vierock et al., 2017] oder ReaChR [Kaufmann et al., 2017] die Proteinabsorption mitbestimmt. Auch in CsChR ist das Aktionsspektrum von E3'A um mehr als 10 nm blauverschoben (siehe Tab. A.5).

Während ein Lysin in Helix 2 den Gegenion pK_a -Wert absenkt und ein Phenylalanin in Helix 2 denselben anhebt und somit beide Seitengruppen entweder einen vollständig deprotonierten oder partiell protonierten Gegenionkomplex fördern, verbleibt die Gegenionkonfiguration der protonenselektiven Kanäle CsChR und DsChR1 mit einem Histidin an gleicher Position unklar. Aufgrund einer möglichen pH-Abhängigkeit der Gegenionkonfiguration ist die Bedeutung des Helix 2 Histidins jedoch spannend und könnte in Zukunft in einer weiterführenden Mutationsstudie ergänzt durch absorptionsspektroskopische Messungen geklärt werden.

5.1.2 Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerk und Elektrostatik der äußeren Pore

Die Gegenionkonfiguration von Chrimson scheint schließlich die zusätzlichen Stabilisierung durch Seitengruppen der zentralen und äußeren Pore zu benötigen¹. Wichtig für die Gegenionkonfiguration von Chrimson sind hierbei sowohl potentiell geladene Reste wie E3', R162 und E300 in der direkten Umgebung des Gegenionkomplexes als auch mehr als 10 Å von der RSBH⁺ entfernte Aminosäuren wie E4', Y159 oder E272 in der extrazellulären Proteinhälfte (Abb. 5.1 b).

Die weiter entfernten Reste der äußeren Pore scheinen direkt die Protonierung des Gegenionkomplexes zu stabilisieren, wie zumindest für E4' gezeigt werden konnte (siehe auch Abb. 4.14 c). Hierfür sind drei Mechanismen denkbar. Zum Ersten bilden sowohl E4' und Y159 als auch E277 und Y163 Chrimson-spezifische interhelikale Wasserstoffbrückenbindungen aus, welche die relative Position von Helix 2, 3 und 7 im Dunkelzustand fixieren und damit die Position der Gegenionseitengruppen sowie die Ausrichtung von F135 mitbestimmen. Zum Zweiten unterbricht insbesondere die Wasserstoffbrückenbindung von E4' und Y159 als Äußeres Tor den in C1C2 beobachteten extrazellulären Zugangskanal und könnte die Protonierung von Ci1 durch eine umstrukturierte Wasserverteilung der zentralen Pore stabilisieren. Drittens sind sowohl E4' als auch E277 in ausgedehnte H-Brücken-Netzwerke eingebunden, in welchen auch E4' über zwei Wasser mit E3' verbunden ist und die pK_a -Werte verschiedener titrierbarer Gruppen der extrazellulären Halbpore und des Gegenionkomplexes - ähnlich wie in BR [Dioumaev et al., 1998, Zscherp et al., 1999] - miteinander gekoppelt sein könnten.

In unmittelbarer Umgebung des Gegenionkomplexes können schließlich geladene Reste die Interaktion von RSBH⁺ und Gegenion direkt elektrostatisch beeinflussen. Insbesondere unterschiedliche Positionen der Guanidiniumgruppe des in den meisten mikrobiellen Rhodopsinen konservierten Helix-3-Arginins (R162 in Chrimson und R82 in BR) beeinflussen je nach Entfernung zur RSBH⁺ die Ladungsverteilung des Gegenionkomplexes und tragen in SRII aus *Natronobacterium pharaonis* wesentlich zur Blauverschiebung der Proteinabsorption bei [Hoffmann et al., 2006, Luecke, 2001]. In Chrimson ist R162 im Vergleich zu BR auswärtsorientiert und verglichen mit

¹Die besondere Bedeutung der genauen Ausrichtung von einzelnen Gegenionkomponenten sowie von derer unmittelbarer elektrostatischer Umgebung verdeutlichen die unterschiedlichen Beiträge der Farbverschiebung nach Substitution des Helix-2-Lysins durch ein Phenylalanin in C1C2 und PsChR ($\Delta\lambda \sim 13$ nm für K132F und K76F [Li et al., 2014a]) sowie der entgegengesetzten Mutationen in CaChR1 ($\Delta\lambda \sim 40$ nm für F139K [Li et al., 2014a]) und Chrimson ($\Delta\lambda \sim 60$ nm für F135K).

C1C2 und *CrChR2* einwärtsverschoben und könnte durch eine schwache elektrostatische Koppelung die Interaktion des Gegenions mit der RSBH^+ modulieren. Hypsochrome Farbverschiebungen von ~ 20 nm konnten auch für Mutanten von E3' und E300 (beide in direkter Nachbarschaft des Gegenionkomplexes) beobachtet werden, welche laut Propka3.1-Analyse bei neutralem pH-Wert protoniert vorliegen (siehe Tabelle A.7), aber dennoch das Wasserstoffbrückennetzwerk der Gegenionumgebung mitgestalten könnten.

Im Gegensatz zu Chrimson ist in *CrChR2* die Farbabsorption von E3'- und E4'-Mutanten kaum oder gar nicht verschoben [Ritter et al., 2008, Sugiyama et al., 2009, Watanabe et al., 2012]. Als vergleichbare Fernwirkung zu der Chrimson Mutante E4'A reduziert jedoch die *CrChR1*-E87Q-Mutante am äußeren Ende von Helix 1 die pH-Abhängigkeit der Proteinabsorption [Tsunoda and Hegemann, 2009]. Während in Chrimson E4'A jedoch der blauverschobene Dunkelzustand - also das deprotonierte Gegenion - stabilisiert wird, wird für *CrChR1*-E87Q ausschließlich der im *CrChR1* WT rotverschobene Dunkelzustand beobachtet und ein protoniertes Ci1 könnte hier stabilisiert werden.

5.1.3 Polarität und Rigidität der Retinalbindetasche

Als dritter Faktor neben der besonderen Gegenionkonfiguration sowie der spezifisch strukturierten extrazellulären Halbpore, trägt schließlich auch die Retinalbindetasche wesentlich zur Farbverschiebung von Chrimson bei. Entsprechend ist die Proteinabsorption der Chrimson-F135K-Mutante mit einer maximalen Absorption bei ~ 520 nm [Urmann et al., 2017, Vierock et al., 2017] im Vergleich zur homologen *CaChR1*-F139K-Mutante mit einem Absorptionsmaximum bei ~ 480 nm weiterhin um ~ 40 nm rotverschoben [Li et al., 2014a].

Wichtig für die Rotlichtabsorption von Chrimson sind in der Retinalbindetasche insbesondere das polare S223 und das raumgreifende M201 am β -Iononring sowie das apolare A298 und das mit Ci2 interagierende Y268 an der RSBH^+ (Abb. 5.1 c). Alle vier Aminosäuren finden sich auch in der Retinalbindetasche von BR, wohingegen sie in *CaChR1* genau wie in C1C2 und *CrChR2* durch ein apolares Glycin und ein kleineres Threonin am β -Iononring sowie ein polares Serin und ein Phenylalanin an der RSBH^+ ausgetauscht sind (Abb. A.5). Während Y268 in Chrimson durch dessen Wasserstoffbrückenbindung mit Ci2 vorrangig an der Positionierung des Gegenions beteiligt zu sein scheint, fördert die Verteilung polarer und polarisierbarer Aminosäuren die Ladungsverschiebung im angeregten Zustand und das raumgreifende Methionin die Planarität des Chromophors und somit die Ausdehnung des konjugierten π -Elektronensystems. Der gleichzeitige Austausch der zu M201, S223 und A298 homologen Seitengruppen in der Protonenpumpe *HwBR* aus dem Archaeobakterium *Haloquadratum walsbyi* führte zu einer Blauverschiebung von mehr als 50 nm, wobei sich die Beiträge der einzelnen Aminosäuresubstitutionen zu addieren und sogar leicht zu potenzieren scheinen [Sudo et al., 2013]. In BR konnte hierbei gezeigt werden, dass insbesondere der Austausch von M118 durch kleinere Aminosäuren eine Blauverschiebung verursacht, wohingegen eine Substitution durch eine ebenfalls große, vermutlich protonierte Glutaminsäure die Proteinabsorption von BR wenig veränderte [Greenhalgh et al., 1993]. Ein polares Serin am β -Iononring und ein apolares Alanin nahe der RSBH^+ finden sich an gleicher Position auch

in den ebenfalls rotverschobenen ChRs ReaChR und C1V1 (Abb. A.5) und genau wie in Chrimson führt auch in C1V1 die Mutation S220G zu einer Blauverschiebung der Proteinabsorption von ~ 10 nm [Prigge et al., 2012], wohingegen die entgegengesetzte Mutation G220S in C1C2 eine Rotverschiebung ähnlicher Größe bedingt [Oda et al., 2018, Schneider et al., 2015]. Obwohl in keinem anderen ChR ein Methionin an der Position von M201 gefunden wird, führt eine homologe Substitution sowohl in C1C2 [Oda et al., 2018] als auch *CrChR2* (Abb. 4.25 c) zu einer Rotverschiebung der Proteinabsorption. Die Wirkung der in der Retinalbindetasche von Chrimson für die Rotlichtabsorption kritischen Aminosäuren M201, S223 und A298 scheint entsprechend zwischen verschiedenen mikrobiellen Rhodopsinen übertragbar zu sein und addiert sich (zumindest theoretisch) auch in Chrimson zu einer Gesamtblauverschiebung von 45 nm, welche fast haargenau dem Absorptionsunterschied der Chrimson-F135K und *CaChR1*-F139K-Mutanten entspricht (siehe oben).

In allen blauverschobenen ChRs - wie *TsChR* aus *Tetraselmis striata*, *TcChR* aus *Tetraselmis cordiformis* und *PsChR* mit maximalen Aktivitäten von 435 nm bis 445 nm [Govorunova et al., 2013, Klapoetke et al., 2014, Schneider et al., 2015, Wietek, 2018] - befindet sich an der Position von M201 (Chrimson) ein Glycin (Abb. A.5), wohingegen das sowohl in Chrimson, BR und *CrChR2* konservierte Glycin G205 (Chrimson) durch ein Alanin ausgetauscht ist. Infolge beider Substitution kommt es sowohl in C1C2 als auch im anionleitenden ChR *iC++* zu einer weiteren Blauverschiebung der Proteinabsorption um mehr als 20 nm [Kato et al., 2015b, Wietek et al., 2017]. Wie strukturebiologisch bestätigt werden konnte (siehe C1C2 GA in Abb. 5.1 c) bewirkt hierbei eine alternative Einpassung der Methylgruppen des β -Iononringes eine Rotation des Ringes, wobei die verdrehte *6-s-cis* Konformation des Retinals das konjugierte π -Elektronensystem verkürzt und eine Erhöhung der Anregungsenergie bedingt [Kato et al., 2015b].

5.1.4 Röter als Chrimson - S169 zwischen Gegenion und Retinalbindetasche

Eine Rotverschiebung der Chrimsonabsorption um mehr als 20 nm konnte schließlich durch die Mutation S169A zwischen Gegenion und Retinalbindetasche erzielt werden. An gleicher Position ist in fast allen ChRs eine Hydroxylgruppe konserviert² (Abb. A.5). Je nach Protein kann diese zwei unterschiedliche Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden, entweder - wie in *CrChR2* [Volkov et al., 2017] und BR [Luecke et al., 1999b] - mit der Carboxyseitengruppe des Ci1 oder - wie in C1C2 [Kato et al., 2012] und Chrimson [Oda et al., 2018] - mit dem Peptidrückgrat seiner eigenen Helix (Abb. 5.1 a). Während das Ci1 in *CrChR2* genau wie in BR deprotoniert ist [Guo et al., 2016], liegt es in Chrimson [Urmann et al., 2017, Vierock et al., 2017] und vermutlich auch in der Kristallstruktur von C1C2 [Kato et al., 2012] protoniert vor. Entsprechend früherer molekular- und quantenmechanischer Simulationen könnten die unterschiedlichen Wasserstoffbrückenbindungen der Hydroxylgruppe direkt aus der unterschiedlichen Protonierung des Ci1 folgen [Watanabe et al., 2013]. Während die Wasserstoffbrückenbindung der Hydroxylgruppe mit der Carboxyseitengruppe des Ci1 sowohl dessen Position stabilisiert als auch dessen pK_a -Wert absenkt [Marti et al., 1991], fördert die Interaktion der Hydroxylgruppe mit dem Proteinrückgrat möglicherweise den

²Eine interessante Ausnahme bildet *CaChR1* mit einem Cystein an der Position von S169 (Abb. A.5).

auch in anderen mikrobiellen Rhodopsinen beobachteten Knick von Helix 3 [Ballesteros et al., 2000, Watanabe et al., 2013].

Interessanterweise führt in BR die zu S169A homologe Mutation T89A nur für das „blaue BR“-der BR-Form mit protoniertem Ci1 - zu einer im Betrag zu Chrimson S169A vergleichbaren Rotverschiebung um 25 nm [Marti et al., 1991, Metz et al., 1992], wohingegen bei neutralem pH-Wert und deprotoniertem Ci1 die selbe T89A-Mutation die Proteinabsorption blauverschiebt [Marti et al., 1991].

In der blauen Form von BR ist - genau wie im Dunkelzustand von Chrimson - der Abstand der beiden Gegenionreste aufgrund der weggefallenen elektrostatischen Abstoßung reduziert und zusätzlich das in BR mit der RSBH⁺ interagierende Wasser W402 verschoben [Okumura et al., 2005]. Indirekt wird hierdurch der Abstand der RSBH⁺ in Helix 7 und des T89/S169 in Helix 3 reduziert, welche in der Dunkelstruktur von Chrimson nur 3,3 Å voneinander entfernt sind (Abb. 5.1). Sowohl die Nähe von S169 zur RSBH⁺ als auch dessen intrahelikale Wechselwirkung mit dem Peptidrückgrat könnten entsprechend in beiden Proteinen durch die Protonierung von Ci1 begünstigt sein. In beiden Fällen könnte eine bathochrome Verschiebung der Proteinabsorption nach dem Entfernen der Hydroxylgruppe - wie in der Chrimson-Mutante-S169A oder der blauen BR-T89-Mutante beobachtet - entweder auf die Reduktion der Polarität der Retinalbindetasche in direkter Umgebung der RSBH⁺ oder auf eine Restrukturierung des Gegenionkomplexes nach Wegfall der intrahelikalen Wechselwirkung und einer möglichen Umstrukturierung von Helix 3 zurückgeführt werden.

Übertragen auf anderer mikrobielle Rhodopsine wäre eine bathochrome Verschiebung der Proteinabsorption durch eine zu S169A-homologe Substitution somit ausschließlich im Fall eines protonierten oder neutral substituierten ersten Gegenions zu erwarten. In der Natriumpumpe KR2 aus dem marinen Flavobakterium *Krokinobacter eikastus* ist das Ci1 durch ein Asparagin substituiert. Gleichzeitig befindet sich jedoch an der Position von S169 eine Asparaginsäure (D116), dessen Substitution die Proteinabsorption von KR2 zwar um bis 50 nm rotverschiebt [Inoue et al., 2013], gleichzeitig jedoch in den Mutanten D116A und D116N zu einem vollständigen Funktionsverlust führt, da D116 in KR2 sowohl das Gegenion als auch den primären Protonenakzeptor darstellt [Inoue et al., 2013] und für den aktiven Na⁺-Transport unentbehrlich ist [Inoue et al., 2013, Kato et al., 2015a]. Im anionleitenden *GtACR1* aus *Guillardia theta* befindet sich hingegen an der Position von S169 ein Threonin [Govorunova et al., 2015], welches wie S169 in Chrimson für die Proteinfunktion entbehrlich sein könnte und dessen Substitution - in Anbetracht des ebenfalls neutral substituierten Ci1 (siehe Abb. A.5)- wie in Chrimson zu einer bathochromen Verschiebung der Proteinabsorption führen könnte. Erst vor kurzem bestätigte ein durch maschinelles Lernen gestützter proteinübergreifender Vergleich von Aminosäuresubstitutionen mikrobieller Rhodopsine insbesondere der Position von S169 einen besonders großen Einfluss auf die Opsinverschiebung mikrobieller Rhodopsine [Karasuyama et al., 2018] und unterstreicht das Ergebnis der FarbabSORPTIONsstudie dieser Arbeit.

5.2 Der Photozyklus von *CrChR2* - Leitende Zustände und Lichtadaptation

Durch zeitaufgelöste Ionenselektivitätsmessungen des dunkel- sowie lichtadaptierten *CrChR2* konnten verschiedene leitende Zustände als elektrophysiologische Photozyklusintermediate bestimmt werden, welche im Folgenden durch spektroskopische Erkenntnisse ergänzt in einem methodenübergreifenden Photozyklusmodell zusammengefasst werden können (Abb. 5.2).

5.2.1 Leitende Zustände des dunkeladaptierten *CrChR2*

Bereits für das dunkel-adaptierte *CrChR2* konnten mit $O_{1,frueh}$ und $O_{1,spael}$ zwei aufeinander folgende Offenzustände zunehmender Kationleitfähigkeit bestimmt werden. Das vollständig dunkeladaptierte *CrChR2* inkorporiert im geschlossenen Dunkelzustand ChR_{470} ausschließlich all-*trans*,15-*anti* Retinal [Becker-Baldus et al., 2015, Bruun et al., 2015, Kuhne et al., 2019], welches nach Belichtung entlang der C13=C14 Bindung isomerisiert und innerhalb weniger μ s in ein blauverschobenes M_{390} -Intermediat mit deprotonierter RSB übergeht. Wie die zeitaufgelösten Messungen dieser Arbeit bestätigen (siehe Abb. 4.23 und [Lórenz-Fonfría et al., 2015a]), erfolgt die Kanalöffnung erst 160 μ s nach Belichtung und entsprechend zeitversetzt zur Deprotonierung der $RSBH^+$. Auch spektroskopisch wurde eine biphasische Entstehung des M-Zustandes mit Zeitkonstanten von 7 μ s und 120 μ s beobachtet [Verhoefen et al., 2010], welche aufgrund der zeitversetzten Kanalöffnung der Entstehung eines frühen geschlossenen und späten protonenleitenden M-Zustandes entsprechen. Unterschiedliche M-Zustände besonderer funktionaler Relevanz erinnern an BR. Während sich jedoch im Zuge des Überganges des ersten zum zweiten M-Zustandes in BR die Zugänglichkeit der Schiffbase von der extrazellulären Seite zur zytoplasmatischen Seite ändert und einen auswärtsgerichteten Protonentransport ermöglicht [Ernst et al., 2014, Nango et al., 2016], könnten ähnliche Konformationsänderungen in *CrChR2* zur Kanalöffnung führen. Nach Kanalöffnung nehmen die Photoströme mit einer Zeitkonstante von 2,5 ms weiterhin zu, wobei die Photostromzunahme - wie bereits an früherer Stelle diskutiert [Lórenz-Fonfría et al., 2015a] - zeitgleich zur Reprotonierung der RSB zu erfolgen scheint. Gleichzeitig kommt es - wie hier erstmals gezeigt werden konnte - zu einer Zunahme der Natriumleitfähigkeit. Der spät M_{390b} und der darauf folgende N_{520} -Zustand können entsprechend verschiedenen leitenden Zuständen unterschiedlicher Protonenselektivität zugeordnet werden. Beide leitenden Zustände wurden auch für *CrChR2* E90Q beobachtet, für welches sowohl der hier elektrophysiologisch bestimmte $O_{1,frueh}$ als auch - wie bereits früher gezeigt [Ritter et al., 2008] - der absorptionsspektroskopisch bestimmte M_{390} -Zustand beschleunigt entstehen und im Vergleich der spektroskopischen und elektrophysiologischen Messungen die Entität von leitendem Zustand ($O_{1,frueh}$) und Photozyklusintermediat (M_{390}) bestätigen. Während die Kanalöffnung des $O_{1,frueh}$ (M_{390b}) infrarotspektroskopisch mit der Hydratisierung von Transmembranhelizes und einem Wassereinstrom in die Pore korreliert, ändern sich zeitgleich zum Übergang in das N_{520} -Intermediat ($O_{1,spael}$) nur einzelne Wasserstoffbrückenbindungen [Lórenz-Fonfría et al., 2015a]. Gleichzeitig kommt es jedoch neben der Reprotonierung der $RSBH^+$ zur Deprotonierung von D156 im DC-Paar [Lórenz-Fonfría et al., 2013] und

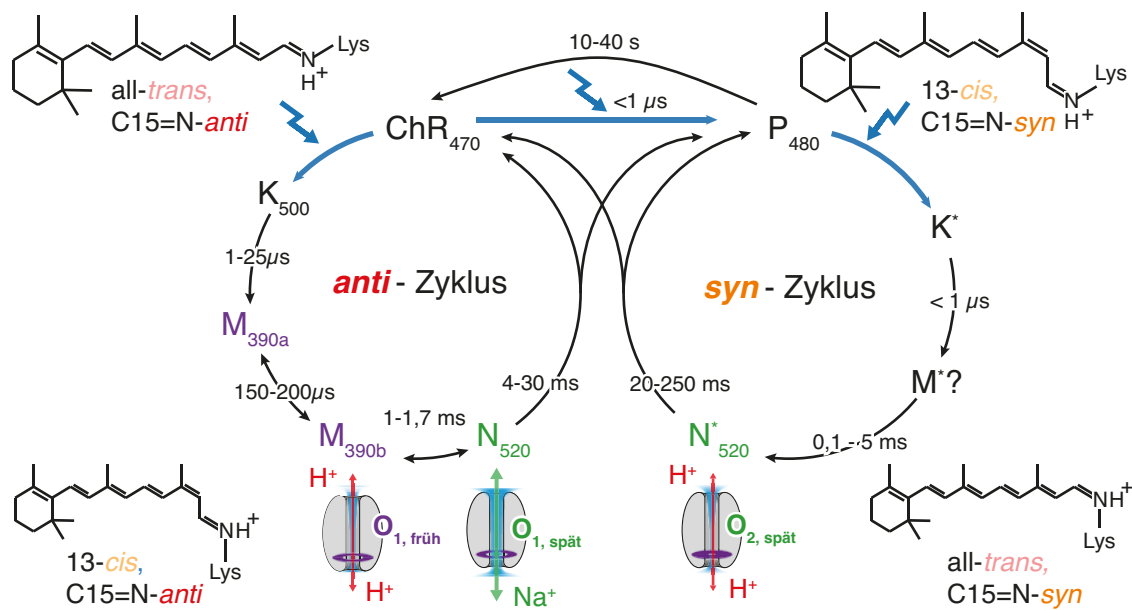


Abbildung 5.2: Methodenübergreifendes Photozyklusmodell von CrChR2 Photozyklusübergänge in CrChR2 mit Zeitkonstanten, zusammengefasst aus [Kuhne et al., 2019, Ritter et al., 2008, Saita et al., 2018] und den elektrischen Messungen dieser Arbeit. Der Retinalchromophor befindet sich im dunkeladaptierten *anti*-Zyklus in der *all-trans*, C15=N-*anti*-Konfiguration (oben links) und isomerisiert nach Lichtabsorption in die *13-cis*, C15=N-*anti*-Form (unten links). Im zweiten, bei längerer Belichtung bevölkerten Photozyklus befindet sich der Chromophor in einer *13-cis*, C15=N-*syn*-Konfiguration (oben rechts) und isomerisiert vermutlich zum *all-trans*, C15=N-*syn*-Retinal (unten rechts). Lichtinduzierte Übergänge sind durch blaue Pfeile dargestellt. Photozyklusintermediate des *syn*-Zyklus sind durch ein * indiziert. Die unterschiedlichen Offenzustände des Kanals sind unter den jeweiligen Photozyklusintermediaten angegeben.

der Deprotonierung einer weiteren bisher nicht identifizierten Seitengruppe, welche für eine zeitgleich erfolgende Protonenabgabe verantwortlich ist [Nack et al., 2012]. Ausschlaggebend für die erhöhte Kationleitfähigkeit des $O_{1,spät}$ könnten lokale Ladungsänderungen in direkter Umgebung der Pore sein, wie an späterer Stelle weiter ausgeführt wird (siehe Abschnitt 5.4.5).

Das Kanalschließen erfolgt schließlich 10-22 ms nach Anregung zeitgleich zur Deprotonierung des Protonenakzeptors D212 und scheint - spektroskopisch bestimmt - vorwiegend eine direkte Rückkehr in den *all-trans*-Dunkelzustand ChR_{470} darzustellen [Kuhne et al., 2019, Lórenz-Fonfría et al., 2013].

5.2.2 Lichtadaptation von CrChR2

Infolge längerer Belichtung kommt es zu einem homogenen Photostromrückgang beider leitender Zustände des dunkeladaptierten Proteins. Dies kann als Entvölkerung des zur Kanalöffnung führenden Photozyklus aufgrund der Akkumulation von zumindest einem weiteren nichtleitenden Photozyklusintermediat interpretiert werden. Trotz langsamer Erholungskinetik des transienten Peakstroms bei wiederholter längerer Belichtung [Nagel et al., 2003] ist der Photostromrückgang bei wiederholten Laserblitzen überraschend gering und Photoströme nehmen bereits nach wenigen Blitzen nicht weiter ab. Dies impliziert, dass der bei wiederholter Belichtung populierte

geschlossene Zustand selbst photoreaktiv in den dunkeladaptierten ChR₄₇₀-Zustand zurückkehrt. Die Photoreaktivität des zweiten Dunkelzustandes konnte schließlich durch die Beobachtung eines zusätzlichen Offenzustandes O₂ mit einer geringen Leitfähigkeit, hohen Protonenselektivität und langsamen Schließkinetik belegt werden, welche ausschließlich nach Aktivierung des lichtadaptierten CrChR2 gebildet wird.

Den zweiten Dunkelzustand könnte das ursprünglich spät im Photozyklus verortete P₄₈₀-Intermediat darstellen [Bamann et al., 2008, Ritter et al., 2008], welches entsprechend infrarotspektroskopischer Retinalmarkerbanden als Produkt einer Photozyklusverzweigung gebildet wird, dessen Zeitpunkt bisher kontrovers diskutiert wurde [Kuhne et al., 2019, Lórenz-Fonfría and Heberle, 2014]. Entsprechend beobachten als Photozyklusverzweigung Lórenz-Fonfría et al. eine nach Kanalschließen nur unvollständige Rückbildung des *all-trans*-Grundzustandes und schlagen einen späten Übergang in den P₄₈₀-Zustand vor [Lórenz-Fonfría et al., 2013]. Kuhne et al. hingegen beobachten eine frühe C15=N-*syn*-Bande, welche parallel zum gesamten *anti*-Photozyklus bis zum Abklingen von P₄₈₀ erhalten bleibt, und schließen auf eine frühe lichtinduzierte Photozyklusverzweigung in den P₄₈₀-Zustand, welcher durch eine Retinaldoppelisomerisierung gebildet wird [Kuhne et al., 2019]. Eine Photozyklusverzweigung in Folge einer alternativen *all-trans*,15-*anti*→13-*cis*,15-*syn*-Doppelisomerisierung bestätigt frühere Modelle zur Lichtadaptation von CrChR2³ [Brun et al., 2015] und könnte - wie für die Lichtadaptation von BR diskutiert [Bryl et al., 1992] - auch zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Photozyklus erfolgen, weshalb sich eine frühe und eine späte Photozyklusverzweigung in den P₄₈₀-Zustand nicht gegenseitig ausschließen müssen.

Die Photoreaktivität des lichtadaptierten P₄₈₀-Dunkelzustandes konnte auch spektroskopisch in zwei nahezu zeitgleich veröffentlichten Studien sowohl durch einen Vergleich von Infrarotspektren bei hoher und niedriger Belichtungsfrequenz [Kuhne et al., 2018] als auch durch den Vergleich von Blitzlichtphotolysespektren des dunkel- oder - durch sechs Sekunden Vorbelichtung [Saita et al., 2018] - lichtadaptierten Proteins bestätigt werden. Beide Methoden beobachten nach Lichtadaptation ein weiteres rotverschobenes N₅₂₀^{*}-Intermediat⁴ mit einer langsamen Zerfallskinetik (~20 ms [Saita et al., 2018] bzw. ~250 ms [Kuhne et al., 2018]), welches entsprechend seiner Infrarotzerfallsspektren zumindest teilweise direkt in den ursprünglichen Dunkelzustand ChR₄₇₀ zurückkehrt [Kuhne et al., 2018]. Erst nach Lichtadaptation zu beobachten und langsamer als die leitenden Zustände des dunkeladaptierten *anti*-Zyklus könnte N₅₂₀^{*} für den O₂-Photostrom verantwortlich sein und somit den elektrisch bestimmten dritten leitenden Zustand darstellen.

Im scheinbaren Widerspruch zu der spektroskopisch bestimmten effizienten Photozyklusverzweigungsrate von 25% [Saita et al., 2018] bis 50% [Kuhne et al., 2019] in den lichtadaptierten P₄₈₀-Zustand, ist die Photostromamplitude des O₂ klein. Hieraus folgt eine nur geringe Leitfähigkeit

³Ein Gleichgewicht des *all-trans*/13-*cis*-Retinals im nicht vollständig dunkeladaptierten Protein wurde bereits früher mittels Resonanzramanspektroskopie [Nack et al., 2009], FTIR-Spektroskopie [Stehfest et al., 2010] und Hochleistungsflüssigkeitschromatographie [Ritter et al., 2013] bestimmt und konnte in der langsamen CrChR2-C128T-Mutante je nach Belichtungsfarbe in unterschiedliche Richtung verschoben werden [Ritter et al., 2013]. Insbesondere im CrChR2-WT änderte sich das Isomerenverhältnis bei Belichtung kaum und gegenläufige Isomerisierungsreaktionen des *anti*- und *syn*-Photozyklus könnten sich gegenseitig ausgleichen [Stehfest et al., 2010]. Die Doppelisomerisierung könnte schließlich auch die langsame thermische Rückkehr von P₄₈₀ in den dunkeladaptierten ChR₄₇₀ erklären. In der CrChR2-E123T-Mutante sind sowohl die Erholung des transienten Photostroms als auch der P₄₈₀-Zerfall beschleunigt [Gunaydin et al., 2010, Lórenz-Fonfría et al., 2015b].

⁴Von Saita et al. als I₃⁵³⁰ bezeichnet.

des lichtadaptierten Offenzustandes, welcher aufgrund der langen Lebenszeit trotzdem wesentlich zum Gesamtphotostrom beitragen kann. Während die geringe Leitfähigkeit des *syn*-Photozyklus den Photostromrückgang unter längerer Belichtung in Übereinstimmung mit früheren kinetischen Modellen erklärt [Hegemann et al., 2005, Nikolic et al., 2009], begründet die hohe Protonenselektivität von O₂ die unter Dauerlicht beobachtete Zunahme der Protonenleitung im stationären Photostrom [Berndt et al., 2010].

5.2.3 E3'/E90 im Photozyklus von CrChR2

Das Verschwinden des O₂-Photostroms in der CrChR2-E90Q-Mutante erlaubt es, die molekulare Funktion der Deprotonierung von E3'/E90 neu zu interpretieren. E3' könnte ausschließlich im lichtadaptierten *syn*-Photozyklus deprotoniert vorliegen und entsprechend eines weiterentwickelten „E90-Helix-Tilt“-Modells durch die Förderung der Porenhydratisierung im P₄₈₀-Zustand die Kanalöffnung im lichtadaptierten Protein vorbereiten.

Spektroskopisch konnte gezeigt werden, dass E3' insbesondere im P₄₈₀-Zustand deprotoniert vorliegt und sowohl Lórenz-Fonfría et al. als auch Kuhne et al. beobachteten eine Reprotonierung von E3' erst bei der Rückkehr in den ChR₄₇₀-Dunkelzustand⁵ [Kuhne et al., 2015, Lórenz-Fonfría et al., 2013]. Obwohl zwei unterschiedliche Zeitpunkte für die Deprotonierung von E3' kontrovers diskutiert wurden - entweder nicht zeitaufgelöst unmittelbar nach der Retinalisomerisierung [Kuhne et al., 2015] oder erst spät im Photozyklus nach Kanalschließen und dem Zerfall des N₅₂₀-Zustandes [Lórenz-Fonfría and Heberle, 2014] - entsprechen sowohl eine frühe als auch eine späte Deprotonierung von E3' den im Abschnitt 5.2.2 diskutierten Photozyklusverzweigungsreaktionen und schließen sich somit gegenseitig bei alternativen Verzweigungsmöglichkeiten nicht unbedingt aus. In beiden Fällen erfolgt ungeachtet des Zeitpunktes der Photozyklusverzweigung die Deprotonierung von E3' unabhängig von der Kanalöffnung der hauptsächlich für den Photostrom verantwortlichen Offenzustände O_{1,frueh}- und O_{1,spaat}, was den bereits früher beobachteten geringen Einfluss von E3'-Mutanten auf die Photostromkinetik erklärt [Ruffert et al., 2011, Sugiyama et al., 2009].

In molekulardynamischen Computersimulationen führt die Deprotonierung von E3' sowohl bei einer 13-*cis*,15-*anti*-Konfiguration des Retinals in C1C2 (K₅₀₀) [Kuhne et al., 2015] als auch bei einer 13-*cis*,15-*syn*-Isomerisierung im lichtadaptierten CrChR2-P₄₈₀-Zustand [Kuhne et al., 2019] zur Ausbildung einer Salzbrücke von E3' mit K93, welche in beiden Fällen eine Hydratisierung der zentralen Pore ermöglicht. In Elektronenspinresonanzmessungen unterscheiden sich Strukturänderungen im photostationären Zustand des CrChR2-WT [Sattig et al., 2013] sowie der CrChR2-C128T-Mutante [Krause et al., 2013] kaum, obwohl im WT vorwiegend der P₄₈₀-Zustand des *syn*-Zyklus und in der C128T-Mutante vor allem der leitende N₅₂₀-Zustand des *anti*-Zyklus akkumulieren dürften. Auch infrarotspektroskopisch wurden große Absorptionsänderungen von Peptidrückgratsschwingungen, welche durch eine Hydratisierung von Transmembranhelices erklärt werden können, bereits unmittelbar nach der Retinalisomerisierung beobachtet und bleiben

⁵Die Reprotonierung von E3' erfolgt hierbei scheinbar direkt aus dem umliegenden Medium, wie der zeitgleich zum P₄₈₀-Zerfall im WT, aber nicht in der E3'A-Mutante zu beobachtenden Protonenaufnahme in Fluoreszenzmessungen zu entnehmen ist [Lórenz-Fonfría et al., 2013].

zumindes teilweise bis zum Abklingen des P_{480} -Zustandes erhalten [Lórenz-Fonfría et al., 2013, Radu et al., 2009, Ritter et al., 2008]. Frühe und späte Strukturänderungen könnten hierbei nicht ausschließlich im *anti*-Zyklus erfolgen, sondern zumindest anteilig auf die parallel erfolgenden Strukturänderungen des P_{480} -Zustandes zurückzuführen sein, die ihrerseits auf die Deprotonierung von E3' zurückgehen. Die physiologische Bedeutung großer Strukturänderungen im *syn*-Zyklus für die Phototaxis der Alge ist unklar und könnte entsprechend der Bedeutung von E3' für diese Strukturänderung direkt in einem CrChR2 E3'Q modifizierten *Chlamydomonas reinhardtii* Stamm untersucht werden.

Eine Deprotonierung von E3' könnte schließlich bei geringer Protonenkonzentration begünstigt sein, wodurch O_2 vorwiegend bei alkalischen pH-Werten gebildet werden würde. Dies könnte sowohl den zunehmend biphasischen Charakter der Kanalschließkinetik bei hohem pH-Wert [Berndt, 2011] als auch den bei alkalischem pH_e -Wert zunehmenden Ionenselektivitätsunterschied von transientem und stationärem Photostrom erklären [Berndt et al., 2010]. In den CrChR2-Mutanten E3'Q, E123T und K93S - welche sowohl direkt als auch indirekt eine Deprotonierung von E3' verhindern - sind die Helixhydratationsmarkerbanden des P_{480} -Zustandes reduziert [Kuhne et al., 2019] und ein Verschwinden des O_2 -Photostroms wäre auch für K93S und E123T zu erwarten. Auch ohne leitenden O_2 -Zustand wird der *syn*-Photozyklus durch eine Doppelisomerisierung des Retinals populiert, weshalb es auch bei saurem pH-Wert genau wie in der CrChR2-E3'Q-Mutante weiterhin zu einem Photostromrückgang unter längerer Belichtung kommt.

Während im *syn*-Photozyklus eine Voröffnung der Pore durch die Deprotonierung von E3' erforderlich zu sein scheint, um eine Protonenleitung nach erneuter Lichtabsorption zu ermöglichen, kann im *anti*-Photozyklus eine Kanalöffnung auch ohne Deprotonierung von E3' erfolgen. Auch im *anti*-Zyklus ist E3' durch einen Wasserstoffbrückenwechsel von N258 (im Dunkelzustand) zu C11/E123 (in der vorgeöffneten Pore) [Ardevol and Hummer, 2018] an der Porenbildung beteiligt, und begünstigt auch hier - in protonierter Form - die Protonenleitung des $O_{1,spat}$.

5.3 Der Photozyklus von Chrimson

Der Photozyklus des rotverschobenen Chrimson unterscheidet sich wesentlich vom Photozyklus anderer ChRs. Je nach pH-Wert oder vorangegangener Belichtung konnten vier thermisch stabile Dunkelzustände identifiziert werden, welche im Folgenden entsprechend vorhandener Analogien zu BR, welches Chrimson in der Umgebung des Retinalchromophors besonders ähnelt, interpretiert werden können.

5.3.1 pH-abhängige Dunkelzustände von Chrimson

Bei einer Erhöhung des extrazellulären pH-Wertes kommt es in Chrimson zu einer deutlichen Blauverschiebung der Proteinabsorption, was auf die Deprotonierung des C11 zurückzuführen ist (siehe auch Abschnitt 5.1.1). Der pK_a -Wert der Dunkelzustandsabsorptionsänderung unterscheidet sich zwischen verschiedenen N-terminal-modifizierten Chrimsonvarianten mit einem $pK_a \sim 6,5$ für das hier beschriebene CsChrimson, einem $pK_a \sim 7,4$ für das unmodifizierte Chrimson [Ur-

mann et al., 2017] und einem $pK_a > 7,0$ für das kristallisierte C1Chrimson [Oda et al., 2018]. Genau wie Seitengruppen der äußeren Halbpore (siehe Abschnitt 5.1.2), beeinflusst somit - im geringeren Ausmaße - auch der extrazellulären N-Terminus den Protonierungszustand des Ci1. Für das aufgereinigte Chrimsonprotein liegen entsprechend der Proteinabsorption bei neutralem pH-Wert die beiden Dunkelzustände $Chr_{alkalisch}$ und Chr_{sauer} , welche sich vorwiegend in der Protonierung des Ci1 unterscheiden (siehe Abb. 5.3 a), gleichzeitig vor. Aktionsspektren in HEK-Zellen sind hingegen erst bei alkalischen pH-Werten blauverschoben. Bei pH_e 7,2 ist das Aktionsspektrum im Vergleich zu pH_e 5,0 nur leicht verbreitert und vorwiegend der rotverschobene Dunkelzustand Chr_{sauer} scheint vorzuliegen⁶.

Spektrale Abweichungen von Absorptions- und Aktionsspektren - wie hier für Chrimson beobachtet - wurden bereits in früheren Publikationen für *CaChR1* [Li et al., 2014a] und *CrChR1* [Berthold et al., 2008] diskutiert. Nach Li et al. [2014a] könnten die spektralen Unterschiede sowohl auf unterschiedliche pK_a -Werte für die Farbverschiebung wichtiger Seitengruppen in Detergenz- oder Lipidumgebung zurückzuführen sein, als auch auf dem Vorhandensein funktional nicht oder weniger relevanter Dunkelzustände beruhen. Chrimson scheint besonders sensitiv bezüglich seiner Umgebungsbedingungen zu sein. Entsprechend führen nach Urmann et al. [2017] bereits in der Proteinaufreinigung verwendete Imidazolkonzentrationen von 50 mM zu einer Absenkung des pK_a der Dunkelzustandsabsorptionsänderung zu $\sim 5,8$, wohingegen die Rekonstitution des aufgereinigten Proteins in Liposomen dessen pK_a auf 8,1 anhebt. Die unterschiedlichen extrazellulären N-Termini und die Lipidumgebung könnten hierbei sowohl die Helixpositionen als auch die Hydratisierung des Proteins beeinflussen und entsprechend zur Anhebung des Gegenion- pK_a -Wertes beitragen⁷. Gleichzeitig wurde elektrophysiologisch unmittelbar nach Erniedrigung des extrazellulären pH-Wertes eine langsame Photostromzunahme beobachtet (siehe Abb. 4.8 b), welche auf einen größeren Photostrombeitrag des bei niedrigen pH-Wert durchlaufenden Photozyklus hindeutet. Bei saurem pH-Wert könnten hierbei sowohl die Leitfähigkeiten als auch die relative Lebenszeiten der leitenden Zustände größer sein.

Auch in BR kommt es durch Protonierung des Ci1 zu einer deutlichen Rotverschiebung der Proteinabsorption zu 605 nm [Subramaniam et al., 1990], was ursprünglich als Purpur-Blau-Übergang beschrieben wurde [Oesterhelt and Stoeckenius, 1971]. Der in der Purpormembran niedrige pK_a -Wert von 3,2 kann durch eine Änderung der Lipidumgebung [Lind et al., 1981, Szundi and Stoeckenius, 1988], eine Reduktion der Kationkonzentration [Chang et al., 1987] und auch durch Mutationen des Gegenionkomplexes [Subramaniam et al., 1990] angehoben werden. Bereits die konservative Substitution D85E - wie sie auch das Ci1 von Chrimson beschreibt - erhöht den pK_a des Purpur-Blau-Überganges auf 6,2 und führt zu einer deutlichen Verbreiterung der Proteinabsorption. Aufgrund der konservierten Retinalbindetasche und des protonierten Ci1 ähnelt Chrimson dem blauen BR, welches als Orientierungshilfe zur Interpretation des Photozyklus von Chrimson dienen kann.

⁶Die Abweichung von Aktions- und Absorptionsspektren ist in Chrimsonmutanten sogar noch verstärkt [Oda et al., 2018].

⁷Trotz ähnlicher Gegenionkonfiguration wird ein zu *CaChR1* vergleichbarer pK_a von $\sim 9,0$ in Chrimson nicht erreicht [Li et al., 2014a].

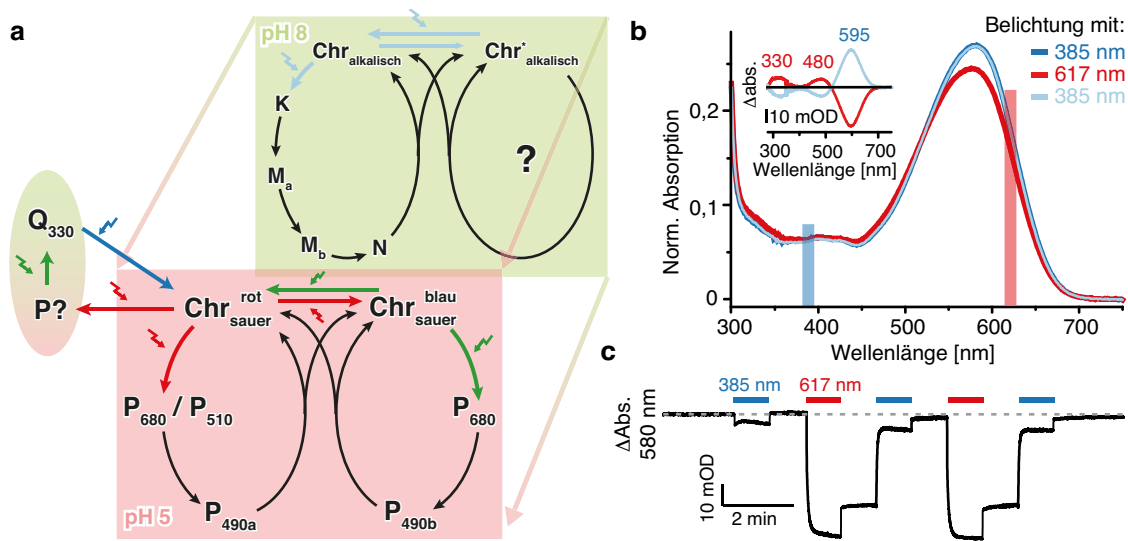


Abbildung 5.3: Photozyklusmodell von Chrimson (a) Vorläufiges Photozyklusmodell von Chrimson mit deprotoniertem Ci1 bei alkalischem pH-Wert (grüne Fläche) und protoniertem Ci1 bei saurem pH-Wert (rote Fläche). $Chr_{rot\ sauer}$ und $Chr_{blau\ sauer}$ werden je nach vorangegangener Belichtung bevölkert und könnten auf unterschiedlichen Wegen entstehen. Das UV-sensitive, für den Dunkelstrom verantwortliche Photozyklusintermediat könnte vermeintlicher Q_{330} -Zustand wie das Q-Intermediat in BR über einen zusätzlichen P-Zustand gebildet werden [Popp et al., 1993]. Bei alkalischem pH-Wert ist der Kanal im M_b -Intermediat mit deprotonierter RSB und bei saurem pH-Wert im P_{490} -Zustand geöffnet. Bei roter Belichtung und pH 5,0 sind mit P_{680} und P_{510} zwei frühe Photozyklusintermediate fast gleichzeitig zu beobachten und der P_{490a} -Zustand entsteht und zerfällt mit Halbwertszeiten von 0,21 ms und 68 ms [Krause, 2018], wohingegen der Photostrom mit einer Zeitkonstante von 0,4 ms zunimmt und 21 ms sowie 90 ms biphasisch abnimmt. Nach grüner Belichtung bei pH 5,0 entsteht P_{490b} mit 0,16 ms und zerfällt mit 75 ms [Krause, 2018] während der Kanal mit 0,21 ms öffnet und mit Zeitkonstanten von 20 ms und 80 ms schließt. **(b)** Absorptionsspektren von CsChrimson bei pH 5,0 nach 60 s Belichtung mit 385 nm bzw. 617 nm sowie anschließender 60 s-Dunkelpause. Einschub: Differenzspektren der Absorptionsspektren nach unterschiedlicher Belichtung. **(c)** Zeitverlauf der Absorptionsänderung bei 580 nm während und nach Belichtung mit UV- und rotem Licht. Daten aus (b) und (c) wurden zusammen mit Dr. Benjamin S. Krause erhoben und sind in ähnlicher Form bereits in dessen Dissertation publiziert [Krause, 2018].

5.3.2 pH-abhängige Photozyklen von Chrimson

Die unterschiedliche Protonierung des Ci1 führt in Chrimson zu verschiedenen Photozyklen bei saurem und alkalischem pH-Wert.

Bei alkalischem pH-Wert können wie in anderen ChRs [Ernst et al., 2008, Ritter et al., 2008] ein frühes rotverschobenes Photozyklusintermediat, ein darauffolgender UV-absorbierender Zustand und ein anschließend erneut rotverschobenes Intermediat beobachtet werden (Abb. 5.3 a grün). Diese könnten einem frühen K-, langlebigen M- und darauffolgenden N-Zustand entsprechen und auf eine frühe Reorientierung, anschließende Deprotonierung und darauffolgende Reprotonierung der RSBH⁺ zurückzuführen sein. Die Kanalöffnung erfolgt während der Ausbildung des mit einer Zerfallskinetik von 110 ms auffällig langlebigen M-Zustandes [Krause, 2018]. Auch in CaChR1 korreliert der Photostrom zeitlich mit einem langlebigen M-Zustand ($\tau \sim 200$ ms) [Sineshchekov et al., 2013]. Eingeleitet wird die Kanalöffnung in CaChR1 durch einen transienten Auswärtsstrom beziehungsweise eine auswärtsgerichtete Ladungsverschiebung, welche in Mutanten von Ci1 abgeschwächt und in Mutanten von Ci2 beschleunigt wird, und einem Protonentransfer von

der RSBH^+ zum Ci1 zugeschrieben wurde. Ein vergleichbarer Auswärtsstrom zum Beginn der Kanalöffnung konnte bei alkalischem pH-Wert auch für Chrimson beobachtet werden und könnte ebenfalls einen Protonentransfer von der RSBH^+ zum bei alkalischem pH-Wert deprotoniertem Ci1 darstellen.

Der Photozyklus von Chrimson bei saurem pH-Wert unterscheidet sich schließlich von allen bisher für ChRs beschriebenen Modellen und vollständig verschieden zeitaufgelösten Absorptionsänderungen wurden beobachtet. Genau dieser Photozyklus beschreibt jedoch jene Konformationsänderungen, welche den für Chrimson charakteristischen rotlichtaktivierten Photostrom ermöglichen. Bei Anregung des blauen BR wurden ausschließlich zwei Photointermediate beobachtet - ein rotverschobener KL-Zustand und ein weiteres blauverschobenes Intermediat, welches als langlebiger L-Zustand bezeichnet wurde [Váró and Lanyi, 1989]. Eine Deprotonierung der RSBH^+ wurde nach Anregung des sogenannte BR_{acid} nicht beobachtet. Auch für Chrimson wurde bei saurem pH-Wert sowohl bei 580 nm- als auch bei 520 nm-Anregung keine Deprotonierung der RSBH^+ beobachtet und auch der bei alkalischen pH-Werten noch zu beobachtende frühe auswärtsgerichtete Photostrom war verschwunden. Anstelle dessen wird ähnlich wie in BR_{acid} ein früher rotverschobener P_{680} - und ein langlebiger blauverschobener P_{490} -Zustand beobachtet, wobei in Chrimson P_{490} den leitenden Zustand darstellt. Obwohl eine Deprotonierung der RSBH^+ nicht vollständig ausgeschlossen werden kann und, wie es auch für Proteorhodopsin diskutiert wurde, nur transient erfolgen könnte [Lörinczi et al., 2009], muss eine Deprotonierung der RSBH^+ für die passive Protonenleitung - anders als für den aktiven Protonentransport - nicht zwangsläufig erforderlich sein. Für das leitende P_{490} -Intermediat konnte ein Absorptionsmaximum von ~ 530 nm für das isoliert Protein⁸ berechnet werden [Krause, 2018]. Dies entspricht einer Blauverschiebung der Dunkelzustandsabsorption um mehr als 50 nm, wie sie in Chrimson sowohl bei alkalischen pH-Wert als auch für Mutationen in der Umgebung des Gegenionkomplexes beobachtet wurde und durch eine Deprotonierung von Ci1 (E165) erklärt werden konnte. Auch während der Kanalöffnung könnte entsprechend eine transiente Deprotonierung des Ci1 erfolgen und die Farbverschiebung des Offenzustandes erklären. Interessanterweise wurde auch für *CaChR1* eine transiente Deprotonierung des Ci1 unmittelbar nach der Retinalisomerisierung diskutiert [Ogren et al., 2015a]. In einem sogenannten „Proton-Relay-Mechanismus“ wird bereits während der Formation des K-Zustandes das Proton vom Ci1 zum Ci2 transferiert, bevor - wie oben bereits diskutiert - ein Proton von der RSBH^+ auf das Ci1 übertragen wird und die Kanalöffnung mit zwei protonierten Gegenionen erfolgt [Ogren et al., 2015b]. Genau wie in anderen ChRs könnte auch in Chrimson Ci2 den primären Protonenakzeptor darstellen, allerdings, nicht wie in *CrChR2* für das RSBH^+ -Proton [Lórenz-Fonfría et al., 2013], sondern wie in *CaChR1* für das Proton von Ci1 [Ogren et al., 2015b]. Ein Protonentransfer von Ci1 zu Ci2 würde in Chrimson durch die räumliche Nähe beider Reste gefördert werden. Die Einbindung beider Gegenionenseitengruppen in den Kanalöffnungsprozess könnte weiterhin die nicht nur für Ci2-, sondern auch für Ci1-Mutanten stark reduzierten Photostromdichten erklären. In anderen ChRs wie *CrChR2* und *ReaChR* sind Photostromamplituden

⁸Photozyklusintermediate wie P_{490} wurden entsprechend der Wellenlänge maximaler Absorptionsänderung in den Differenzspektren der Blitzlichtphotolysemessungen benannt. Absolutspektren der unterschiedlichen Photozyklusintermediate konnten dagegen mit einer aus den Differenzspektren geschätzten Photoaktivierung von 10,5% berechnet werden [Krause, 2018].

von Ci1-Mutanten hingegen nur geringfügig reduziert, wohingegen Photoströme von Mutanten des primären Protonenakzeptors Ci2 genau wie in Chrimson klein sind [Berndt et al., 2011, Gunaydin et al., 2010, Kaufmann et al., 2017, Lórenz-Fonfría et al., 2013]. Auch für BR wurde ein Protonentransfer von Ci1 (D85) zu Ci2 (D212) diskutiert. Aufgrund der nur transienten Protonierung von D85 kann dieser jedoch erst spät im Photozyklus während des O-Zustandes erfolgen [Dioumaev et al., 1999]. In Chrimson ist Ci1 jedoch bereits im Ausgangszustand protoniert und befindet sich mit seiner Carbonylgruppe an gleicher Position wie das Wasser W402 in BR. Dieses erfährt in BR bereits unmittelbar nach der Lichtabsorption aufgrund der Ladungsumverteilung im Retinal eine repulsive Kraft und wird in einer ultraschnellen kollektiven Bewegung des Gegenionkomplexes um bis zu 4 Å von der RSBH⁺ weggestoßen [Nogly et al., 2018]. Eine vergleichbare Wechselwirkung zwischen dem angeregten Elektronensystem des Retinals und der benachbarten Carbonylgruppe des Ci1 könnte auch in Chrimson erfolgen und sowohl eine frühe pK_a-Änderung als auch eine Reorientierung der Gegenionseitengruppen bewirken und dadurch den primären Protonentransfer sowie die Kanalöffnung einleiten.

Weitere spektroskopische Messungen des Chrimson WT und seiner Mutanten sind für den Beleg früher Protonentransferprozesse dringend erforderlich und könnten sowohl infrarotspektroskopisch als auch mit Hilfe von Kernspinresonanzspektroskopie erfolgen. Alternative Protonierungswege können zum aktuellen Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden und die vermutete Deprotonierung des Ci1 könnte auch - entsprechend des bereits diskutierten Einflusses weitläufiger Strukturmotive des Zentralen Tores und der extrazellulären Pore auf die Proteinabsorption - nicht Ursache, sondern Folge der Porenöffnung sein.

5.3.3 Wellenlängenabhängige Lichtadaptation in Chrimson

Zwei weitere geschlossene Dunkelzustände werden in Chrimson bei saurem pH-Wert in Abhängigkeit von der vorangegangenen Belichtungsfarbe bevölkert. Nach blauer Vorbelichtung wird bevorzugt der rote Dunkelzustand ChR^{rot} mit einem Aktivitätsmaximum bei 581 nm und nach roter Vorbelichtung der blaue Dunkelzustand ChR^{blau} mit einem Aktivitätsmaximum bei 543 nm (pH_e 7,2) gebildet (Abb. 5.3 a rot). Eine hypsochrome Verschiebung der Proteinabsorption nach roter Belichtung wurde auch für das aufgereinigte CsChrimson-Protein beobachtet und kann auch hier durch eine 400 nm-Belichtung in den Ursprungszustand zurückgeführt werden (Abb. 5.3 b). Bemerkenswerterweise ist sowohl die Extinktion als auch der Photostrom des blauverschobenen Dunkelzustandes ChR^{blau} reduziert. Eine ebenfalls hypsochrom verschobene und reduzierte Proteinabsorption wurde für das dunkeladaptierte BR beobachtet [Oesterhelt et al., 1973] und konnte auf eine alternative 13-*cis*,15-*syn*-Retinalisomerisierung zurückgeführt werden [Harbison et al., 1984]. Wie in der Lichtadaptation von BR [Sperling et al., 1977] und CrChR2 [Bruun et al., 2015, Kuhne et al., 2019, Ritter et al., 2013] könnten somit auch in Chrimson unterschiedliche Retinalisomerisierungen - vermutlich ebenfalls all-*trans*,15-*anti* und 13-*cis*,15-*syn* - die spektrale Verschiebung beider geschlossener Dunkelzustände erklären.

Während jedoch in BR eine längere Belichtung zur 100%-igen Anreicherung des all-*trans*,15-*anti*-Zustandes führt [Sperling et al., 1977], werden in Chrimson je nach Belichtungsfarbe unterschied-

liche Zustände angereichert. Die Polychromizität von Chrimson erinnert hierbei unmittelbar an ASR aus dem Cyanobakterium *Anabaena Nostoc*, für welches ebenfalls je nach Anregungsfarbe entweder der blaue 13-*cis*,15-*syn*- oder der rote all-*trans*,15-*anti*-Grundzustand angereichert wird [Sineshchekov et al., 2005, Vogeley et al., 2004]. Für ASR ermöglichte die sukzessive Stabilisierung erst früher und dann später Photozyklusintermediate durch unterschiedlich niedrige Temperaturen (170 K und 277 K), die Übergangswahrscheinlichkeiten zwischen beiden Dunkelzuständen zu bestimmen [Kawanabe et al., 2007]. Im Gegensatz zu BR, für welches nach Anregung des 13-*cis*,15-*syn*-Zustandes nur 2-5% der Proteine in den all-*trans*,15-*anti*-Zustand übergehen [Bryl et al., 1992, Gergely et al., 1994, Hofrichter et al., 1989], konvertieren in ASR die Photoprodukte beider Grundzustände vollständig in den jeweils anderen Grundzustand [Kawanabe et al., 2007]. In Chrimson wurden bisher keine Übergangswahrscheinlichkeiten zwischen den beiden Dunkelzuständen bestimmt.

Der Übergang zwischen den blau- und rotlichtadaptierten Photozyklen und entsprechend den Dunkelzuständen $\text{ChR}_{\text{sauer}}^{\text{rot}}$ und $\text{ChR}_{\text{sauer}}^{\text{blau}}$ von Chrimson könnte - genau wie für *CrChR2* diskutiert - sowohl lichtinduziert als auch thermisch erfolgen (Abb. 5.3 a rot). Unterschiedliche thermische und lichtinduzierte Retinalisomerisierungen könnten hierbei in Chrimson durch die veränderte Elektrostatik des Gegenionkomplexes (aufgrund des protonierten Ci1), die veränderte Ladungsverteilung in der Retinalbindetasche (aufgrund der in Chrimson nicht konservierten Asparaginsäure des DC-Paares) und die räumlich beschränkte Retinalbindetasche (aufgrund von M201) begünstigt sein. Entsprechend fördert auch in BR die Protonierung des Ci1/D85 (infolge einer pH-Senkung [Balashov et al., 1996] oder einer pK_a -Anhebung durch die benachbarte R82A-Mutation [Balashov et al., 1993]) die ansonsten thermisch sehr langsame all-*trans*,15-*anti*→13-*cis*,15-*syn*-Isomerisierung. In dehydrierten BR-Filmen, in welchen - ähnlich wie in ChRs - die RSB und ihr Gegenion direkt ohne ein zusätzliches Wasser miteinander interagieren [Hildebrandt and Stockburger, 1984], erfolgt die all-*trans*,15-*anti*→13-*cis*,15-*syn*-Isomerisierung - wie möglicherweise auch in Chrimson - sogar lichtinduziert [Brown and Chomarovsky, 1993, Kouyama et al., 1985]. Negativ geladene Reste der Retinalbindetasche beeinflussen hingegen entsprechend ihrer Position die Ladungsverteilung und Bindungsordnung des Retinals und können spezifische Retinalisomerisierungen gezielt fördern [Cembran et al., 2004]. Insbesondere D156 liegt sowohl in *CrChR2* als auch in ReaChR während des Photozyklus vorübergehend deprotoniert vor [Kaufmann et al., 2017, Lórenz-Fonfría et al., 2013] und könnte in ReaChR und *CrChR2* eine selektive Isomerisierung um die C13-Bindung begünstigen. In Chrimson ist eine homologe Asparaginsäure nicht konserviert, wodurch alternative Retinal-Isomerisierungen nicht ausgeschlossen wären. Auch in der ReaChR-D196N-Mutante (homolog zu D156 in *CrChR2* und C198 in Chrimson) ist entsprechend der Anteil von 13-*cis*,15-*syn*-Retinal im Dunkelzustand erhöht und der Übergang in den *syn*-Zyklus scheint erleichtert erfolgen zu können [Kaufmann et al., 2017]. Als dritter Faktor bestimmt schließlich das Raumangebot der Retinalbindetasche die Wahrscheinlichkeit unterschiedlicher Isomerisierungswege der initialen Photoreaktion. Während in C1C2 entsprechen quantenmechanischer/molekularmechanischer Simulationen die raumgreifendere „Hula-twist“-Isomerisierung gegenüber einem platzsparenden

„Bicycle pedal“-Mechanismus⁹ bevorzugt zu sein scheint und eine hohe Quantenausbeute der 13-*cis*,15-*anti*-Isomerisierung garantiert [Dokukina et al., 2019], könnte in Chrimson die engere Einpassung des Retinals alternative platzsparende Isomerisierungswege begünstigen und alternative Photoprodukte fördern.

Tatsächlich wurden für Chrimson je nach Anregungsfarbe verschiedene Photozyklusintermediate beobachtet. Insbesondere nach roter Anregung ist gleichzeitig zum frühen rotverschobenen (K-ähnlichen) P₆₈₀-Photozyklusintermediat ein weiteres blauverschobenes P₅₁₀-Intermediat zu beobachten, welches einen alternativen Reaktionsweg darstellen könnte. Ein Bifurkation des frühen Photozyklus von Chrimson wurde auch von Urmann et al. in ultraschnellen absorptionspektroskopischen Messungen beobachtet und durch eine energetische Barriere im S₁-Niveau des angeregten Zustandes erklärt, welche je nach Energie des absorbierten Photons unterschiedlich überwunden werden würde [Urmann et al., 2017]. Alternativ könnte die wellenlängenabhängigen Absorptionsänderungen auch auf die Anregung unterschiedlicher Dunkelzustände oder eine frühe Photozyklusverzweigung in den zweiten Dunkelzustand zurückgeführt werden.

Je nach Vorbelichtung unterscheidet sich die Kinetik der Kanalöffnung, wohingegen das Kanalschließen mit einer identischen Zeitkonstante erfolgt. Auch der P₄₉₀-Zustand entsteht bei verschiedener Belichtung unterschiedlich schnell, zerfällt jedoch anschließend mit gleicher Kinetik unabhängig von der Anregungswellenlänge [Krause, 2018]. Die bei saurem pH-Wert gebildeten leitenden Zustände von Chrimson scheinen sich somit unabhängig von der Vorbelichtung oder der Anregungswellenlänge in ihrer Konformation zu ähneln. Gleichzeitig ist sowohl die Photostromamplitude als auch die Lichtsensitivität des blauverschobenen Grundzustandes ChR_{sauer}^{blau} kleiner als die des vermeintlichen all-*trans*-Grundzustandes ChR_{sauer}^{rot}, was durch eine geringe Quantenausbeute der 13-*cis*,15-*syn*→all-*trans*,15-*syn*-Isomerisierung im *syn*-Zyklus erklärt werden könnte, wie sie auch für den *syn*-Photozyklus andere ChRs diskutiert wurde [Ernst et al., 2008, Hegemann et al., 2005, Nikolic et al., 2009].

5.3.4 Chrimson zeigt keine Dunkeladaptation

Im Gegensatz zu CrChR2, scheint in Chrimson keine Dunkeladaptation zu erfolgen. Ein transienter Photostrom, wie dieser in CrChR2 beobachtet wird [Nagel et al., 2003], ist in Chrimson ausschließlich bei einem Wechsel der Anregungsfarbe zu beobachten (von rot nach blau!) und erholt sich selbst in langen Dunkelperioden¹⁰ nicht. Der in vielen Messungen unabhängig von der Anregungswellenlänge beobachtete zusätzliche langsame Photostromrückgang ist nicht auf eine Lichtadaptation des Chrimsonproteins selbst, sondern auf eine Änderung des elektrochemischen Gradienten infolge intrazellulärer pH-Änderungen zurückzuführen und wird in Abschnitt 5.4.2 ausführlicher diskutiert. Auch für das aufgereinigte CsChrimson-Protein konnte keine thermische Relaxation der Absorptionsänderung beobachtet werden (Abb. 5.3 c) und Absorptionsänderungen nach verschiedener Belichtung sind über Minuten stabil.

⁹Im „Bicycle pedal“-Mechanismus erfolgt eine gegenläufige Rotationen der C13=C14- und C15=N-Bindung des Retinals. Im „Hula-twist“-Mechanismus kommt es zur gleichzeitigen Rotation der C13=C14-Doppelbindung und der N-Lysin-Einzelbindung [Dokukina et al., 2019, Liu and Asato, 1985].

¹⁰Getestet wurden Dunkelperioden von bis zu 5 min (Daten nicht gezeigt).

In ASR und auch in *CrChR2* kommt es hingegen in längeren Dunkelperioden zu einer (fast) vollständigen Rückkehr in den *all-trans,15-anti*-Grundzustand [Becker-Baldus et al., 2015, Kawanabe et al., 2006], wohingegen in BR thermisch das *13-cis,15-syn*-Retinal angereichert wird [Scherrer et al., 1989]. Chrimson verbindet in direkter Retinalumgebung Strukturmerkmale sowohl von BR als auch von *CrChR2*, weshalb möglicherweise weder die *13-cis,15-syn*- noch die *all-trans,15-anti*-Retinalkonfiguration thermisch begünstigt ist. Erneut lohnt sich ein Vergleich des diesmal erweiterten DC-Paares, in welchem in Chrimson eine Triade aus C170, C198 und M201 sowohl Übereinstimmung mit BR (T90, D115, M118) als auch mit *CrChR2* (C128, D156 und T159) zeigt, sich jedoch an der Position von C198 (D156 in *CrChR2*) von beiden Proteinen unterscheidet. In der *CrChR2*-D156C-Mutante ist genau wie in Chrimson kein transienter Photostrom mehr zu beobachten [Dawydow et al., 2014]. In BR fördern Mutationen von T90 [Marti et al., 1991] und M118 [Greenhalgh et al., 1993] den Anteil an *all-trans*-Retinal im dunkel-adaptierten Protein und könnten, wie die bereits diskutierte D196N-Mutation in ReaChR [Kaufmann et al., 2017], der energetischen Stabilisierung eines bestimmten Retinalisomers entgegenwirken. Im dunkel-adaptierten Protein formen weiterhin sowohl T90 und D115 in BR als auch C128 und D156 in *CrChR2* (über ein zusätzliches Wasser) Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Helix 3 und Helix 4 [Luecke et al., 1999b, Volkov et al., 2017], welche zumindest in BR wichtig für die Proteinstabilität sind [Perálvarez-Marín et al., 2004] und durch ihren Einfluss auf die Struktur und Rigidität der Retinalbindetasche die thermische *13-cis,15-syn*→*all-trans,15-anti*-Isomerisierung in *CrChR2* und *all-trans,15-anti*→*13-cis,15-syn*-Isomerisierung in BR fördern könnten, jedoch in Chrimson für eine vergleichbare Unterstützung der thermischen Doppelisomerisierung nicht zur Verfügung ständen. Unterschiede in der direkten Chromophorumgebung könnten schließlich auch durch eine Erhöhung der Energiebarrier die thermische Isomerisierung zwischen beiden vorbelichtungssensitiven Dunkelzuständen hinauszögern oder sogar verhindern und ebenfalls das Fehlen der Dunkeladaptation in Chrimson erklären.

5.3.5 Ein langlebiges, UV-sensitives Photozyklusprodukt - der Q-Zustand von Chrimson?

Nach längerer grüner Belichtung wurde schließlich elektrophysiologisch ein fünfter thermisch stabiler Zustand beobachtet, welcher bevorzugt bei alkalischen pH-Werten gebildet wird, sich durch längere Belichtung mit ultraviolettem Licht zurück in den rotverschobenen Grundzustand überführen lässt und einen geringen Dunkelstrom verursacht. Auch für das solubilisierte *CsChrimson*-Protein wurde nach roter Belichtung eine Absorptionzunahme bei 330 nm beobachtet (Abb. 5.3 b), welche dem UV-sensitiven Zustand der elektrophysiologischen Messungen entsprechen könnte. Langlebige, UV-absorbierende Zustände wurden auch in BR und der langsamen *CrChR2*-C128T-Mutante beobachtet [Bruun et al., 2011, Popp et al., 1993, Stehfest et al., 2010]. Entsprechend kommt es in BR nach Anregung des O-Zustand zu einer alternativen *9-cis*-Isomerisierung, welche, von der Hydrolyse der Schiff-Basen-Bindung gefolgt, die blauverschobene Absorption bedingt [Popp et al., 1993]. Ein *9-cis*-Isomerisierung erfolgt auch nach Anregung der blauen BR-Form bei saurem pH-Wert [Fischer et al., 1981], in welcher genau wie im O-Zustand von BR und in Chrim-

son das Ci1 protoniert vorliegt. Insbesondere die Hydrolyse der Retinalbindung folgt in BR nur bei anschließender Alkalisierung und auch in der zu Chrimson homologen BR-D85E-Mutante ist der hydrolysierte Q-Zustand genau wie der UV-sensitive Dunkelstrom in Chrimson vorwiegend bei alkalischem pH-Wert zu beobachten [Ranaghan et al., 2014]. Entsprechend könnte auch in Chrimson die zu BR ähnliche Retinalbindetasche und das protonierte Ci1 eine 9-*cis*-Isomerisierung fördern, welche insbesondere bei alkalischem pH-Wert von der Hydrolyse der Schiff-Basen-Bindung gefolgt den Dunkelstrom verursachen könnte. Gemeinsam mit dem Einfluss der Gegenionmutanten auf die Größe des relativen Dunkelstroms zeigt sich hierin erneut die Bedeutung des Gegenionkomplexes und der RSBH⁺ für die Regulation des Ionenflusses. Insbesondere in Chrimson könnten bereits kleine Strukturänderungen ausreichen, eine passive Protonenleitung zu ermöglichen.

5.4 Protonenleitung und Selektivität

Große Unterschiede der Protonenselektivität verschiedener ChRs konnten in der vorliegenden Arbeit bestätigt und neu aufgezeigt werden. Die höchste Protonenselektivität hatten die 2014 beschriebenen ChRs CsChR und Chrimson. Im Gegensatz zum ebenfalls protonenselektiven DsChR1 aus der halophilen Alge *Dunaliella salina* [Zhang et al., 2011] zeigen Chrimson und CsChR1 auch bei neutralem pH-Wert große Protonenströme und eignen sich aufgrund ihrer guten Expression in humanen Zellen und Neuronen für optogenetische Anwendungen [Klapoetke et al., 2014]. Während CsChR ausschließlich Protonen zu leiten scheint, kann für Chrimson ein Restkationleitfähigkeit beobachtet werden. Die Protonenselektivität der verschiedenen ChRs wirkt sich unmittelbar auf den Anteil von Kationen und Protonen am Gesamtphotostrom aus. Während bei physiologisch hoher Na⁺-Konzentration und neutralem pH-Wert die Photoströme von weniger protonenselektiven ChRs wie des marinen PsChR aus *Platymonas (Tetraselmis) subcordiformis* fast vollständig durch Na⁺-Ionen getragen werden, leiten protonenselektive ChRs wie Chrimson fast ausschließlich Protonen. Entsprechend können ChRs nicht nur in anion- und kationleitende, sondern auch protonenleitende lichtaktivierte Ionenkanäle unterschieden werden (mit kationleitenden ChRs von $P_{H^+}/P_{Na^+} < 10^6$ wie PsChR [Govorunova et al., 2013] und protonenleitenden ChRs mit $P_{H^+}/P_{Na^+} > 10^7$ wie Chrimson).

5.4.1 Chrimson ist ein Protonenkanal

Die hohe Protonenselektivität von Chrimson war ursprünglich überraschend, da in der Erstcharakterisierung von Chrimson kein Unterschied der Ionenselektivität zu CrChR2 beobachtet wurde [Klapoetke et al., 2014]. Methodisch orientiert an Ionenselektivitätsmessungen an C1C2 [Kato et al., 2012] wurden jedoch von Klapoetke et al. ausschließlich Photostromamplituden bei gleicher Haltespannung verglichen. Gleichzeitig wurde mit der Idee, Natriumionen gegen Protonen auszutauschen, im selben Experiment die Na⁺-Konzentration reduziert und die Protonenkonzentration erhöht [Klapoetke et al., 2014], was eine eindeutige Interpretation der Messergebnisse erschwerte. In CrChR2 kompensiert hierbei der bei niedrigem pH-Wert zunehmende Protonenstrom

den aufgrund der Na^+ -Substitution weggefallenen Natriumstrom. In Chrimson kommt es hingegen zu einer Zunahme des Protonenstroms, welcher bei niedrigen pH-Werten in seiner Amplitude zu sättigen beginnt. Weiterhin nehmen auch in *CrChR2* und Mutanten Photostromunterschiede bei hoher und niedriger extrazellulärer Na^+ -Konzentration bei niedrigeren pH-Werten ab [Gradmann et al., 2011] und eine Absenkung des pH-Wertes ist allgemein ungeeignet für einen Vergleich der Protonenselektivität verschiedener ChRs.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Protonen- oder Natriumkonzentration unabhängig voneinander geändert und sowohl Photostromamplitudenänderungen als auch Umkehrpotentialverschiebungen quantifiziert. Die Substitution von Na^+ durch das nicht geleitete NMDG^+ bei gleichem pH-Wert vermeidet pH-induzierte Änderungen der Proteinkonformation und ist besonders geeignet zur Bestimmung der Protonenselektivität. In Chrimson führte der Austausch von Na^+ durch NMDG^+ nur zu geringen Änderungen des Umkehrpotentials und der Photostromamplitude, wohingegen die Reduktion oder Erhöhung der extrazellulären Protonenkonzentration auch bei hoher Na^+ -Konzentration zu großen Umkehrpotentialverschiebungen führte. Umkehrpotentialverschiebungen nach Änderungen der Protonenkonzentration sind deutlich größer für Chrimson als für *CrChR2* [Berndt et al., 2010] wie es unabhängig von dieser Arbeit auch in *Xenopus laevis* Oozyten bestätigt werden konnte [Urmann et al., 2017]¹¹.

5.4.2 Intrazelluläre pH-Änderungen und Photostromänderungen

Längere Aktivierung protonenleitender und transportierender mikrobieller Rhodopsine kann zu intra- und extrazellulären pH-Änderungen führen und sowohl den Protonengradienten über die Membran als auch die Aktivität sekundärer Proteine und Kanäle beeinflussen - wie an verschiedenen Stellen dieser Arbeit gezeigt wurde.

Sowohl Richtung als auch Betrag der intrazellulären pH-Änderung sind nach ChR-Aktivierung von der Membranspannung abhängig. Große Protoneneinströme in HEK293-Zellen führen sowohl durch Chrimson als auch mit langsamerer Geschwindigkeit durch C1V1 und ReaChR bei einer Membranspannung von -60 mV zu einer intrazellulären Ansäuerung von bis zu $\sim 0,63 \pm 0,16$ pH-Einheiten, welche über die gesamte Zelle gemittelt wurde und direkt an der Membranoberfläche noch größer ausfallen könnte. Vergleichbare Änderungen des intrazellulären pH-Wertes um $0,39 - 0,53$ pH-Einheiten wurden bereits früher mit Hilfe des Fluoreszenzindikators SNARF-5F ohne direkte Kontrolle der Membranspannung in *CrChR2* und die ChR-Chimäre ChEF expri-

¹¹Zu einem scheinbar widersprüchlichen Ergebnis kommen Mager et al., die auch in *Xenopus laevis* Oozyten keine unterschiedliche Protonenselektivität von Chrimson und *CrChR2* zu beobachten meinen [Mager et al., 2018]. Im Gegensatz zu allen bisherigen Arbeiten werden jedoch von Mager et al. weder Photostrome noch Umkehrpotentiale gezeigt und die tabellarisch gegebenen Permeabilitätsverhältnisse sind experimentell kaum nachvollziehbar. Unkommentiert werden außerdem die Permeabilitätsverhältnisse von Na^+ zu K^+ oder Na^+ zu H^+ nach unterschiedlichen Methoden bestimmt. Während für die Berechnung von $P_{\text{K}^+}/P_{\text{Na}^+}$ - wie in dieser Arbeit - die relativen Umkehrpotentialverschiebungen in verschiedenen extrazellulären Puffern verwendet werden, erfolgt die Berechnung des $P_{\text{H}^+}/P_{\text{Na}^+}$ -Verhältnisses auf der Grundlage absoluter Umkehrpotentiale bei einer einzelnen alkalischen Messbedingung. Die Berechnung des Permeabilitätsverhältnisses mit Hilfe relativer Umkehrpotentialverschiebungen ist unabhängig von der unbekanntem intrazellulären Kation- und Protonenkonzentration [Hille, 2001]. Bei der Verwendung absoluter Umkehrpotentiale muss hingegen auf Literaturwerte zurückgegriffen werden. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, kann sich jedoch die intrazelluläre Protonenkonzentration während des Experimentes ändern und könnte insbesondere bei alkalischen pH-Werten aufgrund der UV-sensitiven Dunkelströme von Chrimson unzureichend definiert sein.

mierenden HEK293-Zellen gemessen [Lin et al., 2009].

Die intrazelluläre pH-Änderung führt zu einer Reduktion des elektrochemischen Gradienten für Protonen, wie durch die gleichzeitige Messung von pH-Wert-Änderung und Photoströmen gezeigt werden konnte. Der auch an anderer Stelle diskutierte langsame Rückgang des Chrimsonphotostroms [Klapoetke et al., 2014, Sabatier et al., 2018] ist sowohl von der Photostromamplitude als auch der intrazellulären Pufferkapazität abhängig und repräsentiert keine Lichtadaptation oder Inaktivierung des Chrimsonproteins selbst - wie oben für *CrChR2* diskutiert wurde - sondern resultiert aus dem sich während der Aktivierung ändernden Protonengradienten. Trotz vergleichbarer intrazellulärer Ansäuerung bleiben die stationären Ströme von ReaChR und C1V1 groß und die sich ergebenden Umkehrpotentialverschiebung gering. Während infolge der intrazellulären Ansäuerung Protonenströme zurückgehen, werden in Kanälen geringerer Protonenselektivität wie ReaChR und C1V1 andere Kationen weiterhin geleitet. Die relative Protonenselektivität des ChRs beeinflusst entsprechend nicht nur die Geschwindigkeit der intrazellulären Ansäuerung, sondern auch die Stabilität der Photostromantwort bei längerer Aktivierung. Gleichzeitig wurde in anderen Arbeiten ein langsamer Photostromrückgang auch für die ebenfalls protonenselektiven ChRs *CsChR1*, *CaChR1* und auch *CyChR1* aus *Chlamydomonas yellowstonensis* [Hou et al., 2012] beobachtet und könnte auch bei weniger gut untersuchten ChRs als erstes Indiz für eine erhöhte Protonenselektivität dienen.

Große Änderungen des intrazellulären pH-Wertes aufgrund eines kontinuierlichen Protonentransportes sind nicht auf ChRs beschränkt, sondern wurden auch für den Na^+/H^+ -Antiport in Rattenepithelzellen [DeCoursey and Cherny, 1994] oder den spannungsaktivierten Protonenkanal $\text{H}^+\text{Hv1}$ detailliert diskutiert [DeCoursey, 1991, DeCoursey, 2003]. Insbesondere für $\text{H}^+\text{Hv1}$ können hierbei auch bei hoher Pufferkonzentration noch große Verschiebungen des Umkehrpotentials nach längeren H^+ -Auswärtsströmen beobachtet werden [DeCoursey, 1991, DeCoursey and Cherny, 1996]. Ein Rechenbeispiel hilft zu verdeutlichen, warum vor allem die verhältnismäßig geringe Protonenkonzentration durch einen effizienten Protonentransport empfindlich gestört werden kann. Berücksichtigt man, dass bei einem neutralen pH-Wert der Großteil intrazellulärer Protonen an den durch die Pipettenlösung eingeführten pH-Puffer gebunden vorliegt, so kann für eine $15\ \mu\text{m}$ große Zelle und eine Konzentration von $10\ \text{mM}$ HEPES eine intrazelluläre Gesamtprotonenzahl von ~ 10 fmol Protonen berechnet werden. In einem durchschnittlichen Chrimson-Strom von $1\ \text{nA}$ bei $-60\ \text{mV}$ werden bis zu ~ 10 fmol Protonen pro Sekunde geleitet, wodurch sich innerhalb einer Sekunde der intrazelluläre Protonengehalt der Zelle verdoppelt, der intrazelluläre HEPES-Puffer vollständig gesättigt wird und sich der intrazelluläre pH-Wert entsprechend deutlich absenkt. Die Wiederherstellung des intrazellulären pH-Wertes durch den Lösungsaustausch mit der Patchpipette ist hingegen aufgrund der schmalen Pipettenspitze [Oliva et al., 1988] und der trägen intrazellulären Diffusion von Protonen [Al-Baldawi and Abercrombie, 1992, Connor and Ahmed, 1984, Zaniboni et al., 2003] sehr langsam [Pusch and Neher, 1988] und benötigt in Übereinstimmung mit der hier beobachteten Erholung des Photostroms mehrere Minuten [Weinman and Maglova, 1994].

Infolge längerer Aktivierung der Protonenpumpe *CsR* konnte eine extrazelluläre Ansäuerung sowohl durch ein membrangebundenes pHfluorin als auch durch einen koexprimierten protonenak-

tivierten Ionenkanal als pH-Sensor unmittelbar an der Membranoberfläche beobachtet werden. Intrazelluläre pH-Änderungen durch Protonenpumpen wurden hingegen in dieser Arbeit nicht betrachtet. Insbesondere in synaptischen Endungen scheint jedoch die längere Aktivierung von Arch-3.0 zu einer signifikanten intrazellulären Alkalisierung zu führen und induziert die Öffnung von Kalziumkanälen und schließlich die Freisetzung von Neurotransmittern [Mahn et al., 2016]. Bemerkenswerterweise gehen bei längerer Aktivierung auch die Arch3.0-Ströme zurück und genau wie in Chrimson kann auch für Arch3.0 der Photostromrückgang durch ein Anheben der intrazellulären Pufferkonzentration reduziert werden [Mahn et al., 2016]. Anders als in Chrimson resultiert der Photostromrückgang von Arch3.0 jedoch nicht aus dem Abbau des elektrochemischen Gradienten, sondern beruht auf der Reduktion der intrazellulären Protonenkonzentration und auch für die Protonenpumpe CsR nehmen Photoströme bei niedriger intrazellulärer H^+ -Konzentration deutlich ab [Grimm et al., 2018].

5.4.3 Ionenkompetition in Chrimson

Die gleichzeitige Leitung von Protonen, mono- und divalenten Kationen führte in *CrChR2* zur Kompetition um einzelne Bindungsstellen und konnte durch ein kinetisches Enzymmodell beschrieben werden [Gradmann et al., 2011, Schneider et al., 2013]. Sowohl der *CrChR2*-WT als auch die kationeselektiven *CrChR2*-E90Q- und H134R-Mutanten zeigen bei alkalischem pH-Wert große Natriumströme, welche bei einer Erhöhung der extrazellulären Protonenkonzentration zugunsten zunehmender Protonenströme abnehmen [Gradmann et al., 2011]. Gleichzeitig kommt es für die *CrChR2*-Mutanten zu einer Reduktion des Gesamtphotostroms und einer Überschneidung der Stromspannungskurven bei verschiedenen pH-Werten, welche durch eine Kompetition von Na^+ und H^+ erklärt wurde. In Chrimson ist hingegen der Natriumstrom bei alkalischem pH-Wert klein und scheint auch nach Erhöhung des Protonenstrom bei niedrigen pH-Werten nicht weiter abzunehmen. Stromspannungskurven für Na^+ und H^+ überschneiden sich nicht in Chrimson und beide Ladungsträger könnten - anders als in *CrChR2* - unabhängig voneinander geleitet werden. Eine reduzierte Kompetition von Na^+ und H^+ könnte hierbei sowohl durch unabhängige Transportwege als auch durch eine allgemein ineffizientere Natriumleitung ermöglicht werden. Auch in den ebenfalls protonenselektiven *CrChR2*-E123A- und E90H-Mutanten scheint die Kompetition von Na^+ und H^+ reduziert zu sein [Gradmann et al., 2011].

Während der Protonenstrom von Chrimson durch die Präsenz monovalenter Kationen nahezu nicht beeinflusst wird, führt sowohl die Erhöhung der Konzentration divalenter Kationen (wie Ca^{2+} und Mg^{2+}) als auch des organischen Kations Gdm^+ zu einem signifikanten Photostromrückgang. Eine ähnliche Inhibierung des Photostroms durch divalente Kationen wurde auch für *CrChR2* mit Mg^{2+} sowohl in der nativen Alge [Nonnengässer et al., 1996] als auch für das heterolog exprimierte Protein [Schneider et al., 2013] beobachtet und durch eine Blockierung der Pore durch die starke Bindung des divalenten Kations erklärt. Die Struktur von Kalzium- und Magnesiumbindestellen verschiedener Proteine ist divers, involviert jedoch oft spezifisch angeordnete Carbonsäuren als Konjugationspartner des divalenten Metallions [Bindreither and Lackner, 2009, Tang and Yang, 2013]. In *CrChR2* führen die Mutationen S63D und N258D im Zentralen Tor zu einer Erhöhung

der relativen Kalziumleitfähigkeit und wurden als zusätzliche Kalziumbindestelle diskutiert [Plazzo et al., 2012]. In Chrimson befindet sich an der Position von N258 (aus *CrChR2*) mit E300 eine Glutaminsäure. Eine Kalziumbindung im Zentrum der vermeintlichen Pore erscheint dennoch unwahrscheinlich, da weder Kalzium noch Magnesium in Chrimson geleitet werden. Als alternative Mutation führte auch *CrChR2* L132C (auch CatCh genannt) zu einer Erhöhung der Permeabilität divalenter Kationen [Kleinlogel et al., 2011a, Schneider et al., 2013]. Das eingefügte Cystein befindet sich hier auf der Rückseite von Helix 3 und entsprechend vermutlich hinter der Pore, wo es nach Kleinlogel et al. indirekt durch eine Erhöhung der Flexibilität von Helix 3 die Kalziumleitung fördern könnte. Genau entgegengesetzt könnte schließlich in Chrimson eine erhöhte Rigidität der Pore dessen Durchmesser limitieren und die Leitung von Kalzium- und Magnesiumionen verhindern.

Interessanterweise werden Photoströme von Chrimson am stärksten durch extrazelluläres Guanidinium blockiert, welches trotz seiner Größe das in *CrChR2* nach Protonen am besten geleitete Ion darstellt [Nagel et al., 2003] und selbst in Chrimson - zumindest bei alkalischem pH-Wert - mit äußerst langsamer Rate ebenfalls selektiv geleitet wird. Auch im humanen Protonenkanal H^+Hv1 werden Protonenströme durch Gdm^+ blockiert [Tombola et al., 2008]. Sowohl in H^+Hv1 als auch in Chrimson reicht jedoch die Mutation eines einzelnen zentralen Arginins aus - R162 in Chrimson und R211 in H^+Hv1 -, die Blockierung des Photostroms durch Gdm^+ aufzuheben [Berger and Isacoff, 2011]. Während die Guanidiniumleitfähigkeit von Chrimson nur für die Mutante R162H untersucht wurde, konnten für H^+Hv1 15 verschiedene Mutanten an gleicher Position verglichen werden, von welchen ausschließlich das Arginin selbst die Gdm^+ -Leitung verhindert. Das Guanidiniumion entspricht hierbei der Kopfgruppe der Argininseitenkette und wird auch in Arginin-Mutanten der spannungssensitiven Domänen des Shaker-Kanals im sogenannten Omega-Strom geleitet [Tombola et al., 2005]. Genau wie der Photostrom von Chrimson wird auch der Omega-Strom der Shaker-Mutante durch Magnesium blockiert, welches hydratisiert zu groß ist, die in der Argininmutante der Größe des Guanidiniumion entsprechende Pore zu passieren. Der Einfluss der Chrimson-R162H-Mutante auf die Guanidiniumleitfähigkeit bestätigt erstmals für ChRs die Beteiligung des in ChRs hochkonservierten Helix-3-Arginins an der Ausbildung der ionenleitenden Pore.

Die Photostromblockierung durch Guanidinium muss schließlich nicht zwangsläufig auf die Blockierung der Pore selbst zurückzuführen sein. Somit blockiert Gdm^+ , welches sowohl mit polaren, sauren als auch aromatischen Seitengruppen wechselwirken kann, in spannungsaktivierten Kaliumkanälen die Kanalöffnung durch eine Bindung an die Untereinheitsgrenzfläche [Kalia and Swartz, 2011]. Bei hohen lokalen Konzentrationen kann Guanidinium auch zur Denaturierung des Proteins führen [Makhatadze and Privalov, 1992].

Bei niedrigen pH-Werten (pH_e 5-6) kommt es schließlich in Chrimson trotz Konzentrationsanstieg des geleiteten Substrats (Protonen) zu keiner weiteren proportionalen Zunahme der Photostromamplitude, was auf eine Sättigung des Photostroms hindeutet. Im protonenleitenden Gramacidinkanal wird eine Sättigung des Protonenstroms erst bei deutlich niedrigeren Protonenkonzentrationen beobachtet ($<pH_e$ 0) [Cukierman, 2000] und der Protonenleitungsprozess von Chrimson selbst und nicht die Zugänglichkeit der Pore für Protonen könnte dessen Permeabilitätsrate limitieren.

5.4.4 Ein delokalisierte Protonenselektivitätsfilter

Die hohe Protonenselektivität von Chrimson und CsChR1 wird bestimmt durch titrierbare Seitengruppen, welche sich in den verschiedenen ChRs an unterschiedlicher Position der Pore befinden können (Abb. 5.4). Obwohl die Kanalöffnung in CrChR2 durch einen Wassereinstrom eingeleitet wird [Lórenz-Fonfría et al., 2015a], erklärt eine kontinuierliche wassergefüllte Pore die hohe Protonenselektivität der ChRs nicht ($P_{H^+}/P_{Na^+} > 10^6$), sondern resultiert in anderen Kanälen wie Asic1a oder dem Gramicidinkanal nur in einer geringen Protonenpräferenz ($P_{H^+}/P_{Na^+} \sim 5 - 55$ [Chen and Gründer, 2007, Myers and Haydon, 1972]). Im spannungsaktivierten Protonenkanal H⁺Hv1 wurde ein Asparaginsäure-Arginin-Paar in einer Porenverengung als Protonenselektivitätsfilter vorgeschlagen [Dudev et al., 2015]. Wohingegen Kationen und Anionen von den geladenen Resten des Filters elektrostatisch abgestoßen werden, können Protonen die Asparaginsäure vorübergehend protonieren und den Filter passieren. Auch in Chrimson, CsChR1 und CrChR2 sind insbesondere Carbonsäuren entscheidend für die Protonenleitung und -selektivität. Von besonderer Bedeutung sind in Chrimson die Glutaminsäuren E4' und E5' in der extrazellulären Pore und in CsChR1 genau wie in CrChR2 das E3' im Zentralen Tor (Abb. 5.4). Obwohl in den meisten Chlorophyten ChRs konserviert, unterscheiden sich entsprechend die Helix 2 Glutaminsäuren in ihrer Bedeutung für die Protonenleitung. Auch im spannungsaktivierten Protonenkanal H⁺Hv1 kann die H⁺-selektivitätsbestimmende Asparaginsäure an (zwei) verschiedenen Positionen der Pore platziert werden und an beiden Positionen die hohe Protonenselektivität erhalten [Morgan et al., 2013].

Interessanterweise befinden sich die Glutaminsäuren E4' und E5' in direkter Nachbarschaft des in den meisten mikrobiellen Rhodopsinen konservierten Helix-3-Arginins (R162 in Chrimson). Dieses nimmt bereits im Dunkelzustand von Chrimson eine ähnliche Auswärtsorientierung an wie in BR nach Protonierung des Ci1 im M-Zustand [Luecke et al., 2000] und interagiert mit N287 (E204 in BR) in Helix 7. In genau umgekehrter Reihenfolge zu BR könnte in Chrimson die Deprotonierung des Ci1 nach Lichtaktivierung ein Einwärtsklappen des elektrostatisch gekoppelten R162 bedingen und die Kanalöffnung einleiten¹². Infolge des Einwärtsklappens von R162 könnte auch in Chrimson R162 zusammen mit E4' oder E5' einen zu H⁺Hv1 homologen Protonenselektivitätsfilter ausbilden. Eine direkte Interaktion des Helix-3-Arginins mit Seitengruppen in der extrazellulären Hälfte von Helix 1 und Helix 2 ist geometrisch möglich und konnte in der Protonenpumpe CsR als Wasserstoffbrückenbindung zwischen R83 und Y14 in Helix 1 strukturell in dessen Dunkelstruktur beobachtet werden [Fudim et al., 2019]. Bemerkenswerterweise befindet sich Y14 an fast deckungsgleicher Position wie E4' und E5' in Chrimson und erlaubt substituiert durch eine Glutaminsäure (CsR Y14E) passive Einwärtsströme bei negativer Spannung (siehe Abschnitt 4.4). Einen Protonenselektivitätsfilter in der äußeren Pore von Chrimson durch eine transient ausgebildete Salzbrücke zwischen R162 und E4' oder E5' könnte schließlich sowohl die geringe Leitung als auch die Blockierung des Protonenstroms durch Gdm⁺ erklären, dessen Beitrag zur Denaturierung von Proteinen spezifisch auf das Aufbrechen von Salzbrücken

¹²Die reduzierten Photoströme der Chrimson-N287E-Mutante, welche R162 durch eine Salzbrücke in seiner Dunkelzustandskonfiguration fesseln könnte, stützen die Hypothese einer Konformationsänderung von R162 während der Kanalöffnung

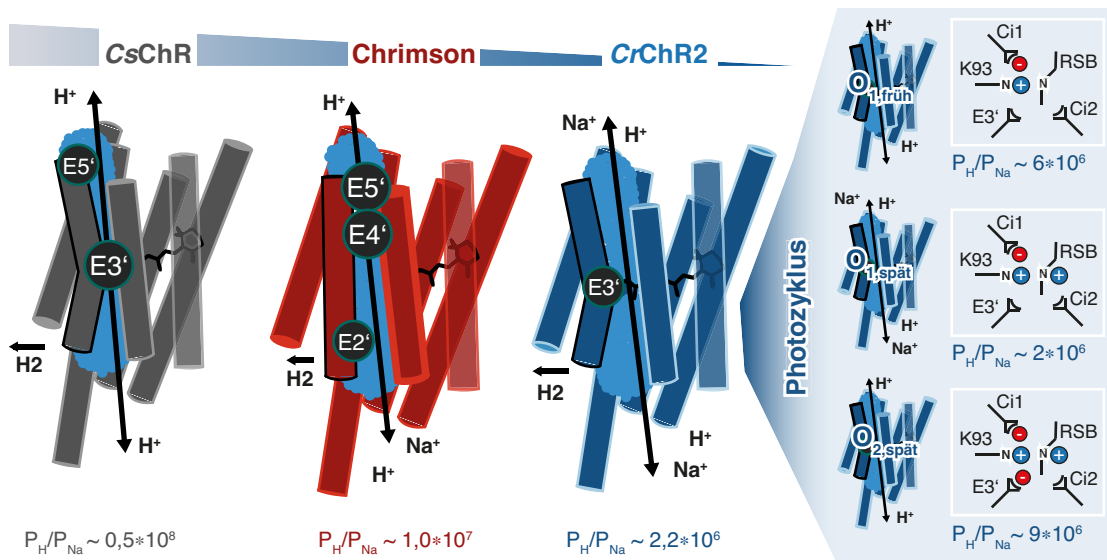


Abbildung 5.4: Molekulare Bestimmungsfaktoren der Protonenselektivität verschiedener ChRs
 Links: Skizzierte Offenzustände der protonenleitenden Kanäle CsChR, Chrimson und CrChR2 mit den die Protonenselektivität bestimmenden Resten (große Kreise) und den die Protonenleitung unterstützenden Resten (kleinere Kreise) sowie der relativen Permeabilität für Protonen (unten). Rechts: Skizzierte Gegenionkonfiguration der Offenzustände von CrChR2. Die angegebenen Permeabilitätsverhältnisse beschreiben die relativen Leitfähigkeiten zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Anregung vor (0,1 ms für $O_{1,früh}$ und 5 ms für $O_{1,spät}$) und nach Lichtadaptation (100 ms für $O_{2,spät}$). Da sich an den verschiedenen Zeitpunkten unterschiedliche leitende Zustände überlagern könnten, werden die Ionenselektivitätsunterschiede der einzelnen Photozyklusintermediate selbst vermutlich unterschätzt.

aus Arginin/Glutaminsäure-Paaren oder Lysin/Glutaminsäure-Paaren zurückgeführt werden konnte [Meuzelaar et al., 2015]. Genau wie Protonen würde hierbei auch Gdm^+ während seiner Leitung an das $E4'$ oder $E5'$ des Selektivitätsfilter binden, dessen Struktur es lokalen und vorübergehend aufbrechen würde.

Weiterhin konnte insbesondere für Chrimson gezeigt werden, dass nicht ausschließlich die negative Ladung, sondern vor allem die Protonierbarkeit der Reste im vermeintlichen Selektivitätsfilter ausschlaggebend für die hohe Protonenselektivität ist. Entsprechend werden die Photoströme auch in der $E4'$ H-Mutante fast ausschließlich durch Protonen getragen, trotz einer potentiell Ladungsinversion der eingefügten Seitengruppe. In funktionaler Übereinstimmung zeigen auch die CrChR2-Mutanten $E3'D$ ($E90D$) und $E3'H$ ($E90H$) eine hohe Protonenselektivität [Eisenhauer et al., 2012], wohingegen neutrale Substitutionen an gleicher Position - wie die Mutation $E90Q$ in dieser Arbeit - die Protonenleitung einschränken. Titrierbare Reste entlang der Pore könnten als potentielle Protonenträger direkt an der Protonenleitung teilnehmen und - platziert in einer Porenverengung - eine hohe Protonenselektivität bedingen. Entsprechend führt auch im Spannungssensor des Shaker-Kanals die Substitution des Arginins R1 durch ein Histidin zu einem passiven Protonenstrom [Starace and Bezanilla, 2004], wohingegen ein Austausch des gleichen Restes durch ein Serin einen passiven Kationstrom erlaubt [Tombola et al., 2005]. Obwohl im Chrimson WT die Protonenselektivität vermutlich durch eine Salzbrücke von $E4'$ oder $E5'$ und R162 bestimmt wird, wären in gleicher Porenverengung auch alternative Selektivitätsfilterkonfigurationen - selbst

mit einem Histidin - möglich. Im Vergleich zum Photostrom des Chrimson WT ist der Protonenstrom der E4'H-Mutante jedoch klein und eine Protonenleitung entlang des eingefügten Histidins ineffizienter.

Während in H^+Hv1 als Folge einer neutralen Substitution der Asparaginsäure D112 Anionen anstelle von Protonen geleitet werden [Musset et al., 2011], leiten in Chrimson alle E4'- und E5'-Mutanten Kationen und zu einem geringeren Anteil als im WT auch weiterhin Protonen. Eine Anionenleitung wird in CrChR2 und C1C2 hingegen nur durch die Ladungsinversion der die Pore flankierenden Glutaminsäuren erreicht [Wietek et al., 2014] oder durch den gleichzeitigen Austausch mehrerer Reste entlang der Pore erzielt [Berndt et al., 2014]. Für eine hohe Anionenselektivität mussten schließlich sowohl in iChloc [Wietek et al., 2015] als auch in iC++ [Berndt et al., 2016] (neben anderen Resten) drei Glutaminsäuren in Helix 2 ausgetauscht werden (in beiden Fällen E2', E3' und E5'). Auch in Chrimson ist zusätzlich zu E4' und E5' auch E2' und in CsChR1 zusätzlich zu E3' auch E5' wichtig für eine effiziente Protonenleitung. Entsprechend scheint die Protonenselektivität von ChRs nichts ausschließlich an einer einzelnen Porenposition bestimmt zu werden, sondern entlang der Pore delokalisiert kontrolliert zu werden. Eine Protonenleitung entlang einer Kette vernetzter Wasser und Glutaminsäuren ist besonders effizient, wenn die pK_a -Werte aller beteiligten Carbonsäuren niedrig sind und das geleitete Proton an keiner Position zu stark gebunden wird [Decoursey, 2003]. Insbesondere eine Absenkung des im Dunkelzustand hohen pK_a -Wertes von E3' (siehe Tab. A.7) könnte entsprechend in CrChR2 wichtig für die Protonenleitung im anti-Zyklus sein und durch Wasserstoffbrückenbindungsänderung von E3' vorbereitet werden [Ardevol and Hummer, 2018, Lórenz-Fonfría et al., 2013]. Während in den meisten Chlorophyten ChRs eine periodische Folge von Glutaminsäuren entlang Helix 2 die Membran als mögliches Gerüst eines Protonenkabels durchspannt, sind in Cryptophyten ChRs keine Glutaminsäuren in Helix 2 konserviert und die Protonenselektivität ist stark reduziert [Govorunova et al., 2016b, Sineshchekov et al., 2017].

5.4.5 Protonenselektivität verschiedener Photozyklusintermediate

Schließlich unterscheidet sich die Protonenselektivität nicht nur zwischen verschiedenen ChRs, sondern variiert auch innerhalb des Photozyklus eines einzelnen ChRs (Abb. 5.4 rechts). Für CrChR2 konnten mit $O_{1,frueh}$, $O_{1,spael}$ und O_2 drei leitende Zustände unterschiedlicher Protonenselektivität bestimmt werden, welche sich in der Retinalisomerisierung, der Protonierung der $RSBH^+$ [Ritter et al., 2008] und der Ladung benachbarter Seitengruppen wie beispielsweise E3'/E90 oder D156 [Lórenz-Fonfría et al., 2013], der Wasserstoffbrückenbindungskonfiguration des Proteins [Lórenz-Fonfría et al., 2015a] und der Porehydratisierung unterscheiden [Kuhne et al., 2019] (siehe Abschnitt 5.2). Insbesondere die Ladungsänderungen im Zentrum des Proteins könnten die Seitengruppeninteraktionen verändern und zu unterschiedlichen Porenkonfigurationen führen und zwei mögliche Szenarien werden im folgenden vorgestellt.

Als erstes mögliches Szenarium könnte im anti-Zyklus die positive Ladung der im $O_{1,spael}$ reprotonierten $RSBH^+$ das benachbarte negativ geladene Ci1 neu ausrichten und zu einer Vergrößerung der Porenöffnung beitragen. Auch im $O_{1,spael}$ stellt das Zentrale Tor eine Porenverengung dar, wie

der Bedeutung der E3'Q-Mutante für die Protonenleitung im selben Zustand entnommen werden kann, und kleine Strukturänderungen könnten die Selektivität des Pore wesentlich beeinflussen. Auch in der Natriumpumpe KR2 ermöglicht erst die Reorientierung des Gegenions in Folge einer Protonierungsänderung der RSBH⁺ die Na⁺-Passage [Kato et al., 2015a].

Als zweites Szenarium könnte ebenfalls im O_{1,frueh}-zu-O_{1,spael}-Übergang nach Deprotonierung von D156 die durch ein zusätzliches Wasser vermittelte Wasserstoffbrückenbindung zu C128 wegfallen oder sich mit dem Cystein als Protonendonator neu orientieren und durch eine Erhöhung der Flexibilität oder Restrukturierung der porenflankierenden Helix 3 die Leitung größerer Kationen fördern. In der CrChR2-T159M-Mutante könnte das in direkter Umgebung eingefügte Methionin den pK_a-Wert von D156 während des gesamten Photozyklus anheben und eine Deprotonierung - wie im homologen D115 in BR [Rüdiger et al., 1997] - verhindern. Strukturänderungen, welche im WT zur Erhöhung der Kationleitfähigkeit im O_{1,spael} führen, würden in CrChR2-T159M nicht erfolgen und könnten die erhöhte Protonenselektivität bei gleichzeitig reduzierter Stromamplitude der Mutante erklären.

Am überraschendsten war schließlich die hohe Protonenselektivität des O₂-Zustandes, da hier bereits im parentalen P₄₈₀-Grundzustand eine Öffnung des Zentralen Tores und eine Hydratisierung der Pore erfolgt [Kuhne et al., 2019] und ursprünglich eine hohe Kationleitfähigkeit für den *syn*-Photozyklus vermutet wurde [Kuhne, 2016]. Auch im *syn*-Photozyklus führt die Deprotonierung einer zentralen Seitenkette (E3') durch eine Änderung seines Interaktionsprofils (hier das Ausbilden einer Salzbrücke zu K93) zur Öffnung des Zentralen Tores [Kuhne et al., 2015, 2019]. Allerdings kommt es im *syn*-Photozyklus von CrChR2 vermutlich zu keiner Deprotonierung der RSBH⁺ und entsprechend auch zu keiner Protonierung des Ci2, welches im *anti*-Zyklus während der gesamten Porenöffnung protoniert vorliegt [Kuhne et al., 2015, Lórenz-Fonfría et al., 2013] und durch seine direkte Interaktion mit der RSBH⁺ wichtig für die Porenöffnung sein könnte [Ardevol and Hummer, 2018]. Auch in BR erfolgt eine Deprotonierung der RSBH⁺ im *syn*-Photozyklus nur bei alkalischem pH-Wert [Drachev et al., 1993], und sowohl begrenzte lokale pK_a-Änderungen [Steinberg et al., 1994] als auch eine intrazelluläre Ausrichtung des RSBH⁺ nach 13-*cis*,15-*syn*→all-*trans*,15-*syn*-Isomerisierung [Logunov et al., 1995] scheinen die Deprotonierung zu verhindern. Obwohl eine Deprotonierung der RSBH⁺ mit einem fluorierten Retinal auch im *syn*-Photozyklus von BR erzielt wurde, führte diese zu keinem Protonentransport und zeigte dass auch weitere Strukturänderungen des *anti*-Zyklus im *syn*-Zyklus nicht erfolgen [Steinberg et al., 1994]. Während somit in CrChR2 die Deprotonierung von E3' eine Porenöffnung durch einen Wassereinfluss in das Zentrale Tor auch im *syn*-Zyklus ermöglicht, unterscheiden sich die Strukturänderungen im Gegenionkomplex und vermutlich auch im Inneren Tor von jenen des *anti*-Zyklus und erlauben nur eine ineffiziente Protonenleitung.

Interessanterweise korrelieren die Photoströme des natriumleitenden ChRs PsChR mit dem N-Zustand [Govorunova et al., 2013] und die Photoströme des protonenselektiven CaChR1 mit einem langlebiger M-Zustand [Sineshchekov et al., 2013] des Photozyklus. Unterschiedliche leitende Photozyklusintermediate könnten somit auch die unterschiedlichen Ionenselektivitäten verschiedener ChRs mitbegründen. Alternative leitende Photozyklusintermediate ermöglichen ebenfalls die Chloridleitung in natürlichen Anionkanälen sowie die Protonenleitung von Chrimson und er-

folgen in einem späten L-ähnlichen Zustand vor Deprotonierung der RSBH⁺ in den Chloridkanälen *GtACR1* [Sineshchekov et al., 2016] und *PsACR1* [Wietek et al., 2016] oder - vermutlich ohne Deprotonierung der RSBH⁺ - in einem späten blauverschobenen P₄₉₀-Intermediat in Chrimson. Eine beachtenswerte Eigenschaft von ChRs ist es schließlich, selbst bei niedriger Protonenkonzentration eine effiziente Kanalöffnung zu ermöglichen [Nagel et al., 2003]. Trotz hoher Protonenselektivität werden insbesondere in der Abwesenheit von Protonen auch andere Kationen geleitet. Andere Protonenkanäle - wie der virale M2-Kanal [Leiding et al., 2010] oder die erst vor kurzem in sauren Geschmackszellen identifizierten murinen Otopetrinkanäle [Tu et al., 2018] - werden hingegen durch Protonen selbst aktiviert und operieren vorwiegend bei höheren Protonenkonzentrationen. Eine selektive Protonenleitung könnte somit auch durch eine Unterbindung der Kanalöffnung oder Reduktion der Ionenleitfähigkeit bei niedrigen Protonenkonzentrationen gefördert werden. Entsprechend sind auch im protonenselektiven *CsChR* Auswärtsströme bei alkalischem pH-Wert wider Erwarten klein und implizieren eine zusätzliche pH-Aktivierung des Photostroms. Eine entsprechende Photostromzunahme bei extrazellulärer Ansäuerung wurde auch in den Chloridkanälen *ChloC* und *iC1C2* beobachtet [Berndt et al., 2014, Wietek et al., 2014] und könnte auf die Stabilisierung der RSBH⁺ bei saurem pH-Wert zurückzuführen sein [Kato et al., 2018]. In Chrimson unterscheiden sich schließlich die Photozyklen bei unterschiedlichen pH-Werten und vollständig verschiedene leitende Zustände scheinen bei saurem und alkalischem pH-Wert gebildet zu werden, wobei eine höhere Leitfähigkeit des protonenselektiven P₄₉₀-Intermediats die selektive Protonenleitung fördern würde. Zusätzlich könnte die verzögerte Photostromzunahme von Chrimson bei einem pH-Wert-Wechsel von pH_e 9,0 zu pH_e 7,2 auf die pH-abhängige Regeneration eines Photozyklusverzweigungsproduktes zurückzuführen sein - möglicherweise dem UV-absorbierenden Q₃₃₀-Zustand.

5.5 Die ionenleitende Pore von Chrimson

Ohne Kanalrhodopsinoffenstruktur kann insbesondere die Bedeutung einzelner Seitengruppen für die Ionenleitfähigkeit und -selektivität helfen, die ionenleitende Pore zu verorten. Diese wird auch in Chrimson vermutlich von Helix 2, 3 und 7 flankiert, wie anhand der Bedeutung von Helix 2 Glutaminsäuren für den Protonenstrom, von R162 in Helix 3 für die Guanidiniumleitfähigkeit und weiteren Resten in Helix 3 und 7 für den UV-sensitiven Dunkelstrom geschlussfolgert werden kann. Inwieweit die Strukturänderungen von Chrimson während der Porenöffnung den mit Kryoelektronenmikroskopie [Müller et al., 2015], gepulster Elektronendoppelresonanzspektroskopie [Krause et al., 2013], Fluoreszenzanisotropie [Volz et al., 2016] oder Infrarotspektroskopie [Krause et al., 2019] beobachteten Strukturänderungen von *CrChR2* ähneln, ist jedoch unklar. Insbesondere für die Leitung von Protonen entlang einzelner protonierbarer Reste und strukturierter Wassermoleküle könnten nur geringe Strukturänderungen notwendig sein.

In allen Kanalrhodopsindunkelstrukturen können ausgedehnte intra- und extrazelluläre Kavitäten beobachtet werden [Kato et al., 2012, 2015b, 2018, Kim et al., 2018, Li et al., 2019, Oda et al., 2018], welche insbesondere in *C1C2* sowie dem Chloridkanal *GtACR1* tief in das Protein eindringen und als Ausgangspunkte der ionenleitenden Pore interpretiert werden können (Abb. 5.5).

und 7 (Abb. 5.5 „Z1“) [Ardevol and Hummer, 2018, Kuhne et al., 2015, 2019, Takemoto et al., 2015] oder seitlich am *13-cis* isomerisierten Retinal vorbei entlang von Helix 6 und 7 [Cheng et al., 2018] (Abb. 5.5 „Z2“) erfolgen. In Chrimson könnten die raumgreifenden Aminosäuren der Retinalbindetasche in Helix 3 und 4 eine seitliche Verschiebung des Retinalchromophors verhindern und eine Protonenleitung entlang „Z2“ erscheint unwahrscheinlich.

Im Dunkelzustand ist die ionenleitende Pore in der Nähe der RSBH⁺ durch das Zentrale Tor (alle Strukturen), auf der zytoplasmatischen Seite durch das Innere Tor (in *CrChR2*, C1C2, iC1C2 und Chrimson) sowie in der extrazellulären Pore durch das Extrazelluläre Tor in *CrChR2* oder ein sich näher an der RSBH⁺ befindendes Äußeres Tor in Chrimson verschlossen (Abb. 5.5 rechts). In allen drei Torregionen sind in Chrimson wichtige Aminosäuren ausgetauscht und interhelikale Wechselwirkungen im Vergleich zu C1C2 und *CrChR2* verändert (Abb. 5.6). Im Inneren Tor scheint die Substitution von H134 (*CrChR2*) durch K176 eine Verschiebung von R310 zu erzwingen, welches in Chrimson eine Salzbrücke mit E2' bildet und nicht - wie in C1C2 und *CrChR2* - mit E1' interagiert (Abb. 5.6 unten). Im Zentralen Tor von Chrimson sind weder S63 noch N258 aus *CrChR2* konserviert und eine interhelikale Wasserstoffbrückenbindung zwischen Helix 1 und 7 - wie sie auch in *CrChR2* und C1C2 vorliegt - wird durch E300 und das Peptidrückgrat von A101 geformt (Abb. 5.6 Mitte). Als zusätzliches Äußeres Tor bilden E4', Y159 und S288 interhelikale Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Helix 2, 3 und 7 und spalten die extrazelluläre, wassergefüllte Kavität beziehungsweise den extrazellulären Zugangskanal wie sie in *CrChR2* und C1C2 auf extrazellulärer Seite des Gegenionkomplexes zu beobachten sind in zwei getrennte wassergefüllte Kammern (Abb. 5.6 oben).

5.6 Molekulare Bestimmungsfaktoren der Photostromkinetik von Chrimson

Ein schnelles Kanalschließen kann in Chrimson ausschließlich durch das Zusammenspiel unterschiedlicher Aminosäuren entlang der ionenleitenden Pore, des Gegenionkomplexes und der Retinalbindetasche erfolgen. Eine mehr als zehnfach langsamere Photostromkinetik wurde sowohl für Substitutionen des zweiten Gegenions Ci2, der Carbonsäuren E2' im Inneren Tor, E300 im Zentralen Tor und E4' im Äußeren Tor als auch des raumgreifenden M201 in der Retinalbindetasche beobachtet. In *CrChR2* retardieren hingegen vorrangig Mutationen des Ci2 sowie des DC-Paares das Kanalschließen [Bamann et al., 2010, Berndt et al., 2009] und entlang der Pore ist ausschließlich E1' von größerer Bedeutung für die Photostromkinetik [Sugiyama et al., 2009]. Eine Beschleunigung des Kanalschließens konnte in *CrChR2* für neutrale Substitutionen des Gegenions Ci1 erzielt werden, wohingegen in Chrimson zusätzlich zu Substitutionen von Ci1 auch Mutationen von S169 in dessen direkter Umgebung, von K176 [Klapoetke et al., 2014] und R310 im Inneren Tor, C198 im DC-Paar sowie weitere Reste in Helix 6 [Mager et al., 2018] die Schließkinetik beschleunigen. Die molekularen Bestimmungsfaktoren der Photostromkinetik sind somit insbesondere in Chrimson über das gesamte Protein verteilt.

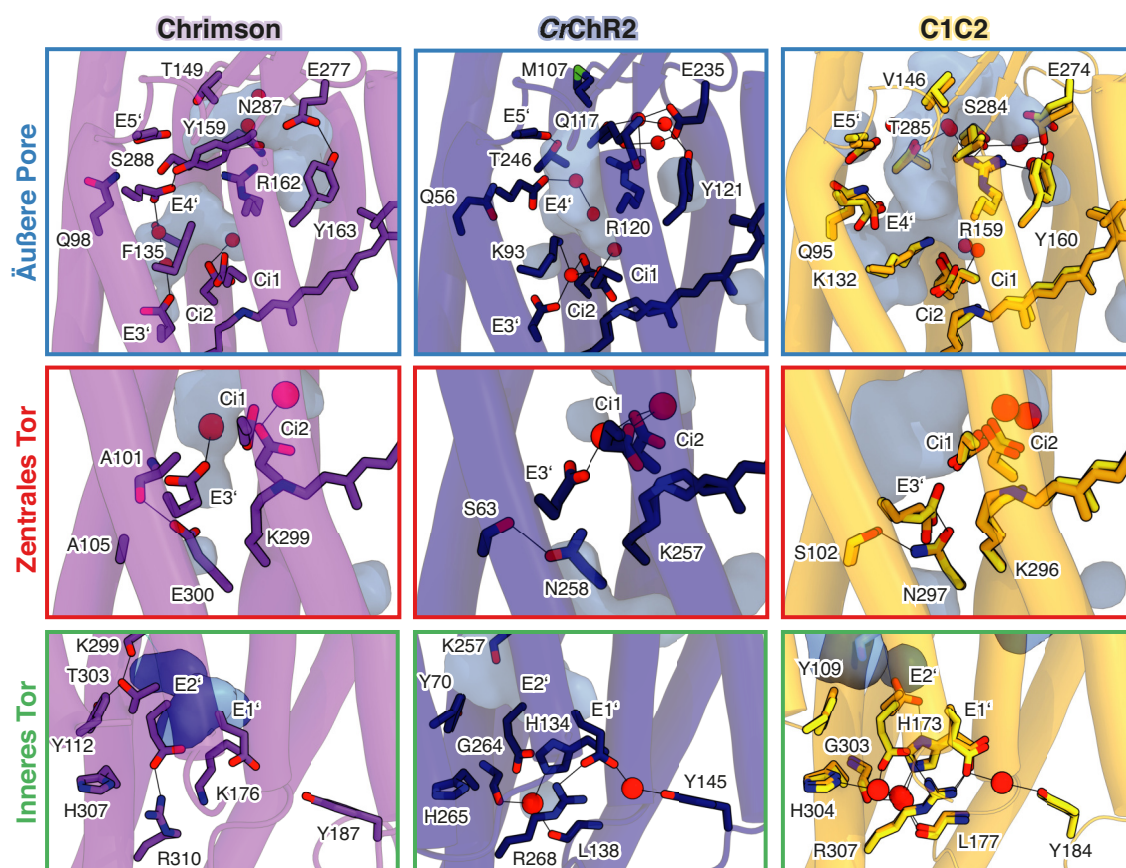


Abbildung 5.6: Strukturbiologischer Vergleich des Inneren Tores, Zentralen Tores und der äußeren Pore verschiedener ChRs Dunkelstrukturen von C1Chrimson (PDB: 5zih [Oda et al., 2018], links), CrChR2 (PDB: 6eid [Volkov et al., 2017], Mitte) und C1C2 (PDB: 3ug9 [Kato et al., 2012] orange und PDB: 4yzi [Kato et al., 2015b] gelb, rechts), dargestellt mit CueMol2.

5.6.1 Molekulare Bestimmungsfaktoren der Photostromkinetik entlang der Pore

Entlang der Pore sind alle für einen schnellen Photostromrückgang wichtigen Seitengruppen in Wasserstoffbrückenbindungen der drei Torregionen involviert (Abb. 5.6). Im Äußeren Tor vermittelt E4' eine Interaktion von Helix 2 und Helix 3. Im Zentralen Tor bildet E300 eine interhelikale Wasserstoffbrückenbindung zwischen Helix 1 und Helix 7 und im Inneren Tor interagiert E2' mit R310 in Helix 2 und Helix 7. Alle drei interhelikalen Wasserstoffbrückenbindungen verbinden porenflankierende Helices und könnten das Kanalschließen durch eine Stabilisierung der Grundzustandskonfiguration fördern. Insbesondere im Inneren Tor entsprechen die alternativen Salzbrücken von E2' und R310 in Chrimson sowie E1' und R268 in CrChR2 der unterschiedlichen Bedeutung beider Carbonsäuren für das Kanalschließen, welches in CrChR2 stärker durch eine Substitution von E1' und in Chrimson besonders durch eine Substitution von E2' retardiert wird [Sugiyama et al., 2009].

Überraschenderweise führte der Austausch der Interaktionspartner von E4' und E2' im Äußeren Tor jedoch nur zu einer geringen Entschleunigung (für Y159A) und im Inneren Tor (für R310A) sogar zu einer Beschleunigung der Kanalschließkinetik. Die besondere Funktion der interhelikalen Wechselwirkungen könnte somit - über die Stabilisierung von Helixpositionen hinausgehend - die

Modulation der pK_a -Wertes der involvierten Glutaminsäuren sein. Entsprechend ist im Inneren Tor der pK_a -Wert von E2' in Chrimson und von E1' in *CrChR2* besonders niedrig (siehe PROPKA3.1-Analyse in Tab. A.7). Auch in Protonenpumpen wie *CsR* oder *BR* beschleunigen Mutationen von T46 als interhelikaler Wasserstoffbrückenbindungspartner des Protonendonors D96 die Photozykluskinetik durch eine Absenkung des Protonendonor pK_a -Wertes [Marti et al., 1991, Vogt et al., 2015]. Während des Photozyklus erlaubt es die interhelikale Wechselwirkung, Konformationsänderungen des Proteins in pK_a -Wert-Änderungen einzelner Seitengruppe zu übertragen, wobei in *BR* die Reprotonierung der $RSBH^+$ durch ein Aufbrechen der interhelikalen Wechselwirkung von T46 und D96 eingeleitet wird [Luecke et al., 2000].

Auch in ChRs wie Chrimson bestimmt der pK_a -Wert porenflankierender Glutaminsäuren die Ladung der Seitengruppe und ihre Möglichkeit, sich an Protonentransferprozessen entlang der Pore zu beteiligen. Je nach Ladung der protonierten oder deprotonierten Glutaminsäuren können verschiedene Porenkonfigurationen stabilisiert werden. Entsprechend interagiert E3' in *CrChR2* oder C1C2 in protonierter Form mit N258 in Helix 7 [Kato et al., 2012] oder dem Ci1 in Helix 3 [Ardevol and Hummer, 2018] und deprotoniert mit K93 in Helix 2 [Kuhne et al., 2015, 2019] mit bereits diskutierten Konsequenzen. Und auch in C1C2 nimmt das E2' in den bei verschiedenen pH-Werten gelösten Kristallstrukturen unterschiedliche Positionen an, welche durch eine alternative Protonierung von E2' erklärt wurden [Kato et al., 2015b]. Entlang der Pore von Chrimson sind verschiedene Glutaminsäuren weiterhin direkt über Wasserstoffbrückenketten miteinander verbunden (wie z.B. E3' und E4' über zwei Wasser) oder befinden sich in direkter Nachbarschaft zueinander (wie z.B. E1' und E2' oder E3', Ci2 und E300) und könnten ihren Protonierungszustand gegenseitig beeinflussen. Während die Porenöffnung durch eine konzertierte Konfigurationsänderung des Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerkes entlang der Pore erfolgen könnte - wie es auch für *CrChR2* diskutiert wurde [Volkov et al., 2017] - könnte die Substitution einzelner Positionen des Netzwerkes auch die Protonierungs- und Strukturänderungen entfernter Reste - sowohl in der geschlossenen als auch der geöffneten Pore - beeinflussen und das Kanalschließen hinauszögern. Je nach Membranspannung könnten die geladenen Reste unterschiedlich im elektrischen Feld der Membran positioniert vorliegen und verschiedene Photozyklusintermediate stabilisiert werden. Insbesondere K176 und R310 sind wichtige geladene Strukturgeber des Inneren Tores und könnten je nach Spannung unterschiedlich positioniert sein. In Mutanten beider Reste ist entsprechend nicht nur der Photostromrückgang beschleunigt, sondern auch die Spannungsabhängigkeit des Photostromrückganges reduziert (mit $\tau_{+30mV}/\tau_{-60mV} = 0,9 - 1,1$ für die Chrimson-Mutanten K176A und R310A im Vergleich zu $\tau_{+30mV}/\tau_{-60mV} = 1,8$ für den WT).

Verschiedene Membranspannungen könnten weiterhin nicht nur die Positionierung geladener Reste bestimmen, sondern zusammen mit protonierbaren porenflankierenden Resten auch unterschiedliche Protonentransferprozesse zur RSB oder dessen direkter Umgebung fördern. Der Protonentransportweg von Protonenpumpen und die protonenleitende Pore von ChRs befinden sich hierbei an fast gleicher Position des Proteins und Protonentransferwege beider Proteingruppen könnten sich ähneln. Sowohl in *BR* [Geibel et al., 2001] als auch in *CsR* ist der Photozyklus schneller, wenn der Protonentransport in Richtung der Membranspannung erfolgt. Ausschließlich die langsamste Zeitkonstante des Protonenpumpstroms ist hierbei spannungsabhängig und korreliert mit

den über längere Distanzen erfolgenden Protonentransferschritten des späten Photozyklus der Protonenpumpen [Fudim et al., 2019]. Spannungsabhängig wird in BR der M-Zustand akkumuliert, wie indirekt durch eine blaulichtinduzierte Bleichung des stationären Photostroms gezeigt werden konnte [Nagel et al., 1998]. Retardierend könnte hierbei sowohl ein bei negativen Spannungen gegen das elektrische Feld erfolgender Protonentransfer zur $RSBH^+$ im $M \rightarrow N$ -Übergang sein, als auch eine spannungsabhängige Photozyklusverzweigung in einen dritten M_1^* -Zustand¹⁴ wirken [Geibel et al., 2001, 2013]. Eine Beschleunigung des CsR-Photostroms bei negativen Spannungen konnte in dieser Arbeit durch das Einfügen einer Glutaminsäure im extrazellulären Halbkanal (Y14E) erzielt werden, welche durch Eröffnung eines zusätzlichen Protonentransferweges (sichtbar als zusätzliche vierte Zeitkonstante τ_4) eine alternative Reprotonierung der RSB aus dem extrazellulären Medium ermöglicht haben könnte.

Auch in Chrimson deprotoniert bei alkalischem pH-Wert zeitgleich zur Kanalöffnung die $RSBH^+$ wohingegen sich bei saurem pH-Wert vermutlich der Protonierungszustand des Gegenionkomplexes ändert. In CrChR2 wird die RSB durch D156 protoniert, [Lórenz-Fonfría et al., 2013, Resler et al., 2015], welches in Chrimson nicht konserviert ist. Entsprechend wurde für Chrimson eine Reprotonierung der RSB durch die protonenleitenden Pore vorgeschlagen [Urmann et al., 2017]. Aufgrund der sowohl bei niedrigem extrazellulären pH_e -Wert und negativer Membranspannung beschleunigten Schließkinetik ($\tau_{+30mV}/\tau_{-60mV} = 1,8$), wäre ein Protonentransfer von der extrazellulären Seite des Proteins bevorzugt. Dieser könnte - wie die Protonenleitung selbst - entlang von E4' und E5' erfolgen, deren Mutationen besonders den Photostromrückgang bei negativen Spannungen verlangsamen und die Spannungsabhängigkeit der Kanalschließkinetik invertieren¹⁵. Ein alternativer Protonentransfer zum Gegenionkomplex könnte, gefördert durch positive Spannungen, auch von der intrazellulären Seite des Proteins erfolgen. E1' und E2' befinden sich an fast deckungsgleicher Position des Protonendonorkomplexes von Protonenpumpen, welche im Fall von ESR genau wie Chrimson ein Lysin an der Position des Protonendonors haben können [Gushchin et al., 2013], und sowohl E1' als auch E2' könnten je nach pH-Wert die Reprotonierung der RSB oder des Ci1 fördern. Während die Reprotonierung der $RSBH^+$ in BR nach Öffnung des inneren Halbkanals über eine transient strukturierte Kette von Wassermolekülen erfolgt [Freier et al., 2011], könnte in Chrimson ein Protonentransfer auch durch E300 unterstützt werden¹⁶. Für neutrale Substitutionen von E1', E2' und E300 im intrazellulären Halbkanal ist die Spannungsabhängigkeit der Kanalschließkinetik¹⁷ verstärkt und insbesondere ein Kanalschließen bei

¹⁴Blaulicht induzierte Einwärtsströme der vorher belichteten Pumpe zeigen einen langsamen thermischen Zerfall des M_1^* -Zustandes von 100-400 ms und deuten entsprechend der Photostromrichtung auf eine lichtinduzierte Reprotonierung von der extrazellulären Membranseite hin. Aufgrund des zusätzlichen spannungsabhängigen Photozykluskurzschlusses ist in BR die Spannungsabhängigkeit der Photostromamplitude stärker ausgeprägt als für die langsame Photostromkinetik. In CsR übertrifft hingegen die Spannungsabhängigkeit der langsamen Zeitkonstante ($\tau_{3,+30mV}/\tau_{3,-60mV} = 0,3$) die Spannungsabhängigkeit der stationäre Photostromamplitude ($I_{+30mV}/I_{-60mV} = 0,5$) und eine nicht zum Pumpstrom beitragende Photozyklusverzweigung müsste nicht zwangsläufig erfolgen.

¹⁵Mit $\tau_{+30mV}/\tau_{-60mV} = 0,4$ für E4'A und $\tau_{+30mV}/\tau_{-60mV} = 0,4$ für E5'A im Vergleich zu $\tau_{+30mV}/\tau_{-60mV} = 1,8$ für den WT.

¹⁶Im Gegensatz zu der Chrimson-Mutante E300N könnte in E300A ein zusätzliches Wasser an der Position der ausgetauschten Carbonsäuren einen Protonentransfer zur RSB oder zum Gegenion weiterhin fördern und die 16-fach schnellere Schließkinetik der Chrimson E300A Mutante im Vergleich zu E300N erklären.

¹⁷ $\tau_{+30mV}/\tau_{-60mV} = 2,7$ für E1'A, $\tau_{+30mV}/\tau_{-60mV} = 2,8$ für E2'A und $\tau_{+30mV}/\tau_{-60mV} = 2,4$ für E300A sowie $\tau_{+30mV}/\tau_{-60mV} = 1,8$ für den WT.

positiven Spannungen retardiert. Während Protonentransferreaktionen in Protonenpumpen in zeitlich getrennten Schritten zu einem Protonentransport über die gesamte Membran führen, können Protonentransferschritte in ChRs lokal begrenzt erfolgen und sich elektrisch gegenseitig aufheben, wie jüngst für *GtCCR2* gezeigt werden konnte [Sineshchekov et al., 2017].

Zusammengefasst könnten somit sowohl Protonentransferprozesse entlang der Pore als auch die Ausrichtung geladener Reste oder interhelikaler Wasserstoffbrückenbindungen der Porenregion die Photostromkinetik von Chrimson bestimmen und Protonierungsänderungen in direkter Umgebung des Chromophors fördern beziehungsweise unterschiedliche Proteinkonfigurationen stabilisieren. Die Bedeutung von Protonentransferreaktionen für die Kanalkinetik könnte durch Azid als Protonenträger [Le Coutre et al., 1995] überprüft und die Beteiligung einzelner Seitengruppen an selbigen über den kinetischen Isotopeneffekt in deuteriertem Wasser getestet werden. In den BR-Mutanten D96N und D96G kann durch Azid die Reprotonierung der RSB auch ohne Protonendonor beschleunigt [Tittor et al., 1989] und der Photostrom wiederhergestellt werden [Geibel et al., 2013]. Auch in *CrChR2* C128T wurde der N_{520} -Zerfall und entsprechend entweder die Reprotonierung von D156 oder die Deprotonierung des Ci2 durch Azid beschleunigt [Stehfest et al., 2010]. In Chrimson wäre der Einfluss von Azid auf die Photostromkinetik insbesondere für die langsamen E300N- und E300A-Mutanten interessant.

5.6.2 Molekulare Bestimmungsfaktoren der Photostromkinetik in der Retinalbindetasche

Die Rückkehr in den Dunkelzustand erfolgt in Chrimson bei saurem pH-Wert direkt aus dem leitenden P_{490} -Zustand und das Kanalschließen könnte unmittelbar durch die Rückisomerisierung des Retinals eingeleitet werden. Im Fall der vorgeschlagenen transienten Protonierungsänderung des Ci1 während der Kanalöffnung würde dessen Reprotonierung durch einen Protonentransfer entlang der Pore (siehe vorigen Abschnitt) die thermische Isomerisierung des Retinal fördern, wie es auch für BR diskutiert wurde [Balashov et al., 1996]. Den größten Einfluss auf das Kanalschließen hat schließlich auch in Chrimson mit M201 ein Rest der Retinalbindetasche. Anders als D156 in *CrChR2* kann M201 in Chrimson nicht zur Reprotonierung der RSB beitragen und muss die Photozykluskinetik auf andere Art und Weise beschleunigen. Entsprechend könnte M201 direkt die Rückisomerisierung des Retinal einleiten. Hierfür würde M201 durch einen „nukleophilen Angriff“ seines Schwefelatoms auf das benachbarte C7-Atom des Retinals die Bindungsordnung des Retinals verschieben und eine Isomerisierung um die C13=C14-Bindung fördern, wie ursprünglich von Patzelt et al. für das homologe M118 in BR diskutiert wurde [Patzelt et al., 2002]. Nach Patzelt et al. wäre insbesondere ein Methionin für einen nukleophilen Angriff zur Förderung der Retinalisomerisierung geeignet, da das Schwefelatom „einen weichen nukleophilen Charakter“ und große nicht-bindende Orbitale hätte, aufgrund der Ethylenkette die nötige Flexibilität besäße und wegen des „sekundären Schwefelatoms“ auch die „Reversibilität“¹⁸ der Interaktion mit dem Retinal gefördert würde [Patzelt et al., 2002]. Auch in BR ist somit in der M118A-Mutante sowohl die Photozykluskinetik verlangsamt als auch die Pumpaktivität reduziert [Greenhalgh et al., 1993].

¹⁸In Teilen sind hierbei die gewählten Begrifflichkeiten frei übersetzt nach Patzelt et al. [2002].

Eine direkte Interaktion des in mikrobiellen Rhodopsinen stark konservierten Cysteins C128 (in *CrChR2*) mit dem Retinal zur Förderung der Rückisomerisierung wurde auch auf Grundlage der Kristallstruktur von C1C2 diskutiert [Kato et al., 2012] und auch in *CrChR2* T159M führt das Einfügen des Methionins zu einer Beschleunigung der Photostromkinetik bei gleichzeitiger D156C-Substitution. Ein nukleophiler Angriff des Schwefelatoms eines Cysteins der Retinalbindetasche konnte schließlich spektakulär für das Typ-II-Rhodopsin Opn5L1 nachgewiesen werden, für welches dieser jedoch weniger reversibel zur Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen Cystein und dem C11-Kohlenstoff des Retinals führt [Sato et al., 2018].

Zusätzlich zur direkten Wechselwirkung mit dem Elektronensystem des Retinals könnte M201 eine Rückisomerisierung des Retinals auch sterisch vorantreiben. In QM/MM-Simulation von C1C2 erfolgt die 13-*cis*-Isomerisierung des Retinals durch eine Seitwärtsverschiebung in den Proteinfreiraum um C167 und D195 (C1C2) zwischen Helix 3 und 4 [Cheng et al., 2018]. Dieser Hohlraum wird in Chrimson durch M201 eingenommen, wodurch das isomerisierte Retinal destabilisiert werden könnte und eine Rückisomerisierung begünstigt wäre. Eine sterische Wechselwirkung von M201 und Retinal als Triebfeder später Photozyklusübergänge würde auch die schnellere Kinetik der Chrimson-M201N-Mutante im Vergleich zu den Substitutionen M201C und M201T erklären. Auch in Chrimson führte schließlich das Wiedereinfügen der in den meisten ChRs konservierten Asparaginsäure des DC-Paares in Helix 4 zu einer Beschleunigung der Photostromkinetik. Da für Chrimson bei saurem pH-Wert eine Deprotonierung der $RSBH^+$ gar nicht oder nur sehr kurzlebig erfolgt, kann das beschleunigte Kanalschließen von Chrimson C198D nicht - wie in *CrChR2* [Lórenz-Fonfría and Heberle, 2014] - auf eine schnellere Reprotonierung der $RSBH^+$ zurückzuführen sein. Auch im rotverschobenen ReaChR beschleunigt die Asparaginsäure im DC-Paar die Kanalschließkinetik sowie den Zerfall des zumindest in *CrChR2* leitenden N-Zustandes, deprotoniert jedoch erst verzögert zur Reprotonierung der RSB und kann entsprechend nicht den Protonendonator der $RSBH^+$ darstellen [Kaufmann et al., 2017]. Während der beschleunigende Einfluss der DC-Paar Asparaginsäure auf die Photozykluskinetik entsprechend proteinübergreifend konserviert ist, könnte ein direkter Protonentransfer von D156 zur RSB in *CrChR2* einen Sonderfall unter ChRs darstellen. In Chrimson wird das wiederingeführte DC-Paar genau wie das DT-Paar in BR durch das ebenfalls für die Kinetik bedeutungsvolle Methionin M201 flankiert. Ein Einfluss der Seitengruppe an der Position von M201 (T159 in *CrChR2*) auf das DC-Paar wurde hierbei bereits für C1V1 beobachtet, in welchem sich an selbiger Position ein Cystein befindet [Prigge et al., 2012] und führt in der *CrChR2*-C128S-T159C-Doppelmutante zu einer erneuten Beschleunigung der langsamen Photostromkinetik der C128S-Mutante durch die zusätzliche T159C-Mutation [Prigge et al., 2012]. In BR bilden die zum DC-Paar homologen Reste T90 und D115, flankiert durch das M118, eine direkte Wasserstoffbrückenbindung aus, welche wesentlich zur Proteinstabilität beiträgt [Joh et al., 2008], wohingegen C128 und D156 in *CrChR2* nur über ein zusätzliches Wasser interagieren [Volkov et al., 2017]. In der Chrimson-C198D-Mutante könnte sowohl die wasserermittelte Wechselwirkung des DC-Paares als auch eine direkte Wasserstoffbrückenbindung wie in BR ausgebildet werden und die Interaktion von Helix 3 und 4 konsolidieren. Aufgrund des zusätzlichen Methionins könnte das 198D in Chrimson während des Photozyklus protoniert bleiben - genau wie D115 in BR [Rüdiger et al., 1997] - und die Wasserstoffbrückenbindung von C170

und C198D über den gesamten Photozyklus erhalten. Dies könnte die Porenöffnung destabilisieren und tatsächlich sind sowohl in Chrimson C198D als auch in *CrChR2* T159M, welche beide als erweitertes DC-Paars eine DCM-Triade besitzen, die Photostromamplituden drastisch reduziert.

5.7 Undichte Pumpen und transportierende Kanäle

Mit der Protonenpumpenmutante *CsR* Y14E und den ChR-Mutanten *CrChR2* T159M und Chrimson E4'A/E4'Q wurden in dieser Arbeit drei Konstrukte beschrieben, welche Protonen sowohl passiv leiten als auch aktiv zu transportieren scheinen. Für alle vier Konstrukte ist entsprechend trotz symmetrischer Ionenbedingungen das Umkehrpotential mit $E_{rev} = -44 \pm 6$ mV für *CsR* Y14E, $E_{rev} = -37 \pm 2$ mV für *CrChR2* T159M und $E_{rev} = 7,4 \pm 1,3$ mV / $E_{rev} = 19 \pm 4$ mV für *CsChrimson* E4'A/E4'Q eindeutig negativ und sogar positiv im Vergleich zu einer ausschließlich passiv erfolgenden Ionenleitung ($E_{rev} = 10$ mV) verschoben und Ladungen werden sowohl passiv geleitet als auch zusätzlich auswärts und sogar einwärts gepumpt.

Zur Beschreibung eines sowohl aktiven als auch passiven Protonentransportes im selben Protein schlägt Dr. Arend Vogt als „Pump-Kanal-Dualismus“ drei verschiedene Modelle vor [Vogt, 2017]. Als „sequentielles Modell“ (nach Vogt [2017] auch „Step-by-Step“-Modell) erfolgen passiver und aktiver Protonentransport zu unterschiedlichen Zeitpunkten eines unverzweigten Photozyklus. Im „Verzweigungsmodell“ (auch „branching“-Modell) führen nach Anregung des Protein alternative Reaktionswege in einen passiv leitenden und einen aktiv pumpenden Photozyklus. Im „Heterogenitätsmodell“ (auch „Two ground states“-Modell) liegen unterschiedliche Dunkelzustände im Gleichgewicht miteinander vor, welche in separaten Photozyklen entweder aktiv Protonen transportieren oder passiv Protonen leiten.

Verschiedene Dunkelzustände scheinen hierbei in allen drei beschriebenen undichten Protonenpumpen vorzuliegen. Je nach pH-Wert weichen die Umkehrpotentiale von *CsR* Y14 in *Xenopus laevis* Oozyten unterschiedlich von den theoretisch berechneten Werten eines reinen Protonenkanals ab. Eine passive Protonenleitung erfolgt insbesondere bei alkalischem pH-Wert mit vermutlich deprotonierten Y14E wohingegen bei saurem pH_e Y14E protoniert ist und *CsR* Y14E weiterhin aktive Protonen transportiert [Fudim et al., 2019]. In Chrimson E4'A entwickelt sich der einwärtgerichtete Pumpstrom erst nach wiederholter Belichtung, wohingegen in *CrChR2* T159M der aktive Protonentransport vom transienten zum stationären Photostrom abnimmt. Sowohl in Chrimson E4'A als auch in der *CrChR2* T159M könnte es als Lichtadaptation zu einer Änderung der Retinalisomerisierung kommen und alternative Photozyklen je nach Belichtungsdauer bevölkert werden. Auch im syn-Phototzyklus von *CrChR2* T159M könnte - genau wie in BR oder dem *CrChR2*-WT [Drachev et al., 1993, Kuhne et al., 2019] - keine Deprotonierung der RSBH⁺ erfolgen, was die Abnahme der Pumpaktivität im stationären Photostrom der *CrChR2* T159M-Mutante erklären könnte.

5.7.1 Passive Protonenleitung von CsR Y14E

Wie bereits für andere undichte CsR-Mutanten vermutet wurde [Vogt et al., 2015], erfolgt der passive Photostrom in CsR Y14E erst spät im Photozyklus, wohingegen unmittelbar nach Anregung die Auswärtsströme der Mutante jenen des WT ähneln. Einwärtsströme treten hierbei zeitgleich zur spannungsabhängigen Photostromkomponente des WT auf, welche in BR mit der Reprotonierung des RSBH⁺ assoziiert werden konnten [Geibel et al., 2001] und während welcher der intrazelluläre Halbkanal geöffnet ist. Gleichzeitig zur Öffnung des intrazellulären Halbkanals könnte in CsR-Y14E eine Salzbrücke zwischen dem deprotonierten Y14E und R83 in Helix 3 ausgebildet werden und den extrazellulären Halbkanal öffnen, was einen passiven Protonenfluss über die gesamte Membran ermöglicht. Die Salzbrücke von Y14E und R83 scheint sich erst während des Photozyklus zu bilden und ist in molekular dynamischen Simulationen des CsR-Y14E-Dunkelzustandes nicht zu beobachten, was die kaum veränderten frühen Photoströme der Mutante erklärt [Fudim et al., 2019].

Einwärtsströme von CsR Y14E repräsentieren weiterhin keine Änderung der Protonentransportrichtung - wie es für Proteorhodopsin diskutiert wurde [Friedrich et al., 2002, Lörinczi et al., 2009] -, da eine Zunahme der Photoströme bei negativen Spannungen nicht mit einer Beschleunigung der Photostromkinetik einhergeht. Gleichzeitig wurden Einwärtsströme von CsR Y14E ausschließlich in Richtung des elektrochemischen Gradienten beobachtet.

5.7.2 Auswärtsprotonentransport von CrChR2 T159M

Eine entgegengesetzte Reihenfolge von Pump und Kanalstrom wurde in der CrChR2 T159M-Mutante beobachtet, wo ein früher passiver Photostrom von einem Auswärtsprotonentransport gefolgt wird (siehe Abb. 4.25 f).

Bemerkenswerterweise ist auch im CrChR2-WT 5 ms nach Anregung im späten Photozyklus ein geringer Auswärtsstrom in der Abwesenheit eines elektrochemischen Gradienten zu beobachten, welcher eine geringe Umkehrpotentialverschiebung von -5 ± 4 mV bewirkt und der in verschiedenen Arbeiten postulierten residualen Pumpaktivität von CrChR2 [Feldbauer et al., 2009, Nack et al., 2012] entsprechen könnte. Die für den kleinen Auswärtsstrom verantwortlichen Protonentransferprozesse könnten in CrChR2 noch während der Kanalöffnung des $O_{1,sp\ae t}$ erfolgen und bei positiven oder negativen Spannungen durch die geöffneten Pore in unterschiedliche Richtungen verlaufen. In der CrChR2 T159M-Mutante ist das Kanalschließen hingegen beschleunigt und die erhöhte Protonenselektivität deutet darauf hin, dass ausschließlich der protonenleitende $O_{1,frueh}$ -Zustand zum passiven Photostrom beiträgt. Entsprechend könnte die Pore während der Protonentransferprozesse des späten Photozyklus bereits verschlossen sein. Im CrChR2 WT erfolgen im Zeitfenster der Auswärtsströme von CrChR2-T159M die Reprotonierung der RSB [Ritter et al., 2008], erst die De- und dann die Reprotonierung von D156 [Lórenz-Fonfría et al., 2013] sowie die Deprotonierung des Ci2 [Kuhne et al., 2015, Lórenz-Fonfría et al., 2013]. Zur Erklärung des auswärtsgerichteten Protonentransportes der CrChR2 T159M-Mutante könnte entsprechend wie in BR die RSBH⁺ von der zytoplasmatischen Seite des Proteins protoniert werden, die Protonenabgabe des Ci2 zum extrazellulärem Medium hin erfolgen oder D156 sein Proton zum extrazellu-

lären Medium hin abgeben oder von der zytoplasmatischen Seite des Proteins her empfangen. Im ersten Szenario könnte T159M den pK_a -Wert von D156 über den gesamten Photozyklus anheben, welches entsprechend genau wie D115 in BR nicht mehr deprotonieren würde [Rüdiger et al., 1997]. Ohne Deprotonierung des D156 könnte sowohl die Ausbildung der kationleitenden Pore des $O_{1,spael}$ verhindert als auch eine alternative Reprotonierung der $RSBH^+$ aus dem intrazellulären Medium oder durch Reste des Inneren Tores erzwungen werden und den Auswärtstransport erklären.

Alternativ könnte die Mutation T159M - entsprechend der Bedeutung des homologen Methionins in Chrimson - die Reisoomerisierung des Retinals beschleunigen und zur frühen Schließung des intrazellulären Halbkanals führen, während der extrazelluläre Halbkanal weiterhin geöffnet bliebe. Unabhängige Schaltprozesse für den extrazellulären und intrazellulären Halbkanal wurden auch in BR auf der Grundlage verschiedener M-Zustände diskutiert [Luecke et al., 2000]. Während in BR Wasserstoffbrückenbindungsänderungen und Ladungsverschiebungen im Gegenionkomplex elektrostatisch Strukturänderungen im extrazellulären Halbkanal bedingen, führen sterische Konflikte des isomerisierten und relaxierenden Retinals mit der Retinalbindetasche und Helix 7 zur Öffnung des intrazellulären Halbkanals. Nach Schließen des intrazellulären Halbkanals müsste in *CrChR2-T159M* die Protonenabgabe des Ci2 zur extrazellulären Seite des Protein erfolgen, wohingegen im WT das Proton durch die geöffnete Pore je nach Spannung in beide Richtung der Membran abgeben werden könnte.

Als Drittes könnte schließlich in der *CrChR2-T159M*-Mutante genau wie im *CrChR2-WT* die Reprotonierung von D156 unabhängig von der Porenöffnung über eine alternativen Protonentransferweg erfolgen, welcher - wie es auf Grundlage der *CrChR2*-Kristallstruktur diskutiert wurde [Volkov et al., 2017] - auf zytoplasmatischer Seite entlang von Helix 4 und 5 verlaufen könnte. Unterschiedliche Protonentransferwege, welche den Auswärtsprotonentransport im späten Photozyklus der *CrChR2-T159M*-Mutante erklären, könnten durch zeitaufgelöste FTIR-Spektroskopie am isolierte *CrChR2-T159M*-Protein bestimmt und durch zusätzliche Mutationen verstärkt werden. Indirekt geben Sie hierbei auch Aufschluss über den Verlauf und die Richtung von Protonentransferprozesse im *CrChR2-WT* und sind mechanistisch von proteinübergreifendem Interesse.

5.7.3 Einwärtsprotonentransport von Chrimson E4'A

In Chrimson E4'A erfolgt der aktive Einwärtstransport von Protonen früh im Photozyklus und wird durch wiederholte Belichtung gefördert (Abb. 4.19 f und g). Phänomenologisch ähneln die Einwärtsströme von Chrimson E4'A der blaulichtinduzierten M-Zustandsbleichung in BR [Geibel et al., 2001] oder den Einwärtsströmen von Proteorhodopsin bei saurem pH-Wert oder neutraler Substitution des Ci1 [Lörinczi et al., 2009]. Die Einwärtsströme von Proteorhodopsin wurden hierbei nach dem IST-Modell durch eine frühe Zugänglichkeitsänderung der $RSBH^+$ und einer anschließenden Protonenabgabe an das Zytoplasma in einem Zwei-Photonen-Prozess erklärt, wobei ein auswärtsgerichteter Protonentransfer in Proteorhodopsin durch das protonierte Gegenion verzögert und somit unterbunden wurde [Lörinczi et al., 2009]. Auch in Chrimson E4'Q (und weniger E4'A) könnte der extrazelluläre Protonentransferweg entlang der Pore durch die Glutaminsäure-

substitution im Äußeren Tor versperrt sein und wie in Proteorhodopsin eine Protonenabgabe in zytoplasmatische Richtung erzwingen. Genau wie in einwärtsgerichteten Protonenpumpen [Shevchenko et al., 2017] findet sich mit E300 auch in Chrimson eine Glutaminsäure auf der zytoplasmatischen Seite der RSB, welche als Protonenakzeptor einen einwärtsgerichteten Protonentransport unterstützen könnte (siehe Abb. 5.6 Mitte). Entsprechend der Zunahme des Einwärtsstromes bei wiederholter Belichtung könnte der Einwärtstransport genau wie in ASR [Kawanabe et al., 2007] oder Einwärtsprotonenpumpen [Inoue et al., 2016] durch unterschiedliche Retinalisomerisierungen sowohl um die C13=C14- als auch die C15=N-Bindung erfolgen und möglicherweise durch mehrfache Lichtabsorption beschleunigt werden. Wie im IST-Modell für Proteorhodopsin diskutiert, könnten hierbei verschiedene Retinalisomerisierungen erst den intrazellulären Halbkanal öffnen und dann den Protonentransport auslösen [Lörinczi et al., 2009]. Sowohl die Herkunft des transportierten Protons als auch der dazugehörige Photozyklusübergang sind aus aktuellen spektroskopischen Messungen nicht ersichtlich und unterschiedliche Belichtungsprotokolle und Temperaturen sollten auch spektroskopisch verwendet werden.

5.7.4 Kurzes Fazit zu Pump-Kanal-Mutanten

Während in Protonenpumpen die Öffnung des extrazellulären Halbkanals (CsR-Y14E) eine passive Ionenleitung im späten Photozyklus ermöglicht, können umgekehrt in ChRs Zugänglichkeitsänderungen der RSBH⁺ sowie der sie umgebenden protonierbaren Reste vor und nach Kanalöffnung zu einem aktiven Protonentransport führen. Zugänglichkeitsänderungen erfolgen hierbei nicht ausschließlich durch eine Umorientierung der RSB, sondern auch durch die Öffnung des intra- oder extrazellulären Halbkanals und werden kinetisch durch den Retinalchromophor und dessen Einbettung (CrChr2 T159M) mit Protonierungsänderungen weiterer Reste koordiniert. In passiv leitenden Kanälen ist im leitenden Zustand die Zugänglichkeit zu beiden Seiten der Membran gewährleistet, kann aber durch Substitution polarer Reste (Chrimson E4'A) je nach Position im Protein in unterschiedliche Richtungen gestört werden. Bemerkenswerterweise scheinen sowohl in lichtgetriebene Protonenpumpen als auch in lichtaktivierten Protonenkanälen Protonierungsänderungen und Porenöffnung nicht strikt gekoppelt zu sein und erlauben eine zeitliche Trennung von aktiven Protonentransport und passiver Protonenleitung entsprechend des „Sequentiellen Modells“ des „Pump-Kanal-Dualismus“, wobei unterschiedlichen Pump- und Kanalbeiträge zum Gesamtphotostrom durch das Verhältnis der verschiedenen Dunkelzustände entsprechend des „Heterogenitäts-Modells“ bestimmt werden.

5.8 Optogenetische Werkzeuge erhöhter Spezifität

Die detaillierte Charakterisierung verschiedener ChRs ermöglicht es, diese optogenetisch gezielter anzuwenden und neurophysiologische Ergebnisse genauer zu interpretieren. Lichtaktivierte Kanäle einer hohen Spezifität leiten idealerweise nur eine einzige Ionensorte und werden nur durch Licht einer bestimmten Wellenlänge aktiviert. ChRs einer bestimmten Ionenselektivität erlauben es, die physiologische Bedeutung von Strömen dieses Ions spezifisch zu testen. Werden in einem

optogenetischen Experiment verschiedene licht-sensitive Proteine gleichzeitig verwendet, so sollten diese unabhängig voneinander anregbar sein. Rotlichtaktivierte ChRs können unabhängig von blaulichtsensitiven Photorezeptoren angeregt werden und sollten ihrerseits (idealerweise) durch blaues Licht nicht aktiviert werden.

5.8.1 Chrimson und CsChR

Chrimson ist aufgrund seiner im Vergleich zu anderen ChRs hohen Einzelkanalleitfähigkeit (siehe Abschnitt 4.6.1) und rotverschobenen Absorption besonders geeignet für optogenetische Anwendungen im Gewebe, wo große Eindringtiefen des Anregungslichtes gefragt sind. Aktuell findet Chrimson insbesondere in Fliegen weite Verwendung [Simpson and Looger, 2018], wo es durch die Kutikula im sich frei bewegenden Tier angeregt werden kann [Klapoetke et al., 2014]. Während die geringe Kalziumleitfähigkeit bei längerer (oder wiederholter) Belichtung - wie sie in *in vivo* Experimenten verwendet werden [Hampel et al., 2017, Tanaka et al., 2017] - einen Vorteil darstellt, könnte die hohe Protonenleitfähigkeit eine intrazelluläre Ansäuerung beschleunigen und zu einem ausgeprägten Photostromrückgang führen. Zur Auslösung von Aktionspotentialen sind große Protonenströme unphysiologisch und könnten auch durch lokale pH-Änderungen die Erregbarkeit des Neurons beeinflussen [Ruffin et al., 2014]. Der Einfluss unterschiedlicher Protonenselektivitäten verschiedener ChRs auf deren Photostromantwort im Neuron ist bisher nicht untersucht. Dass sich ChRs vermeintlich gleicher Funktionalität in optogenetischen Experimenten wesentlich unterscheiden können, konnte für C7ChR2, Chronos und Chrimson gezeigt werden, welche auf Grund unterschiedlicher Kinetiken bei gleichem Belichtungsprotokoll eine diametral unterschiedliche Netzwerkantwort hervorriefen [Jun and Cardin, 2018].

CsChR stellt aktuell das einzige ausschließlich protonenleitende ChR dar, welches gut in Säugerzellen exprimiert und auch bei neutralem pH-Wert noch große Protonenströme zeigt. In der Vergangenheit konnte mit Hilfe von C7ChR2 (als weniger spezifischen Protonenkanal) die während eines Schlaganfalls zu Zellschäden führende Glutaminsäurefreisetzung auf die intrazelluläre Ansäuerung von Gliazellen zurückgeführt werden [Beppu et al., 2014]. In der Zukunft könnte CsChR Protonenströme noch gezielter prüfen. Beispielsweise in der inneren Membran von Mitochondrien exprimiert, könnte CsChR als lichtjustierbares H⁺-selektives Leck die Wirkungsweise als Protonenträger fungierender entkoppelnder Proteine (UCP für „uncoupling proteins“) übernehmen und die Bedeutung von Protonenleckströmen in Mitochondrien in verschiedenen Zelltypen und Krankheitsbildern von Fettleibigkeit [Busiello et al., 2015] bis hin zu kardiovaskulären Erkrankungen [Cheng et al., 2017] testen. Unterschiedliche Strategien zur Lokalisation von ChRs in die innere Mitochondrienmembran wurden erst vor kurzem entwickelt [Ernst et al., 2018, Tkatch et al., 2017].

5.8.2 ChrimsonS und ChrimsonSA

Die molekulare Charakterisierung von Chrimson ermöglichte es, dessen relative Protonenpermeabilität um Größenordnungen zu reduzieren und die Proteinabsorption um 20 nm rot zu verschieben (Abb. 5.7 a). Der rotlichtaktivierte Natriumkanal ChrimsonS (für ChrimsonS(odium) bzw. Chrim-

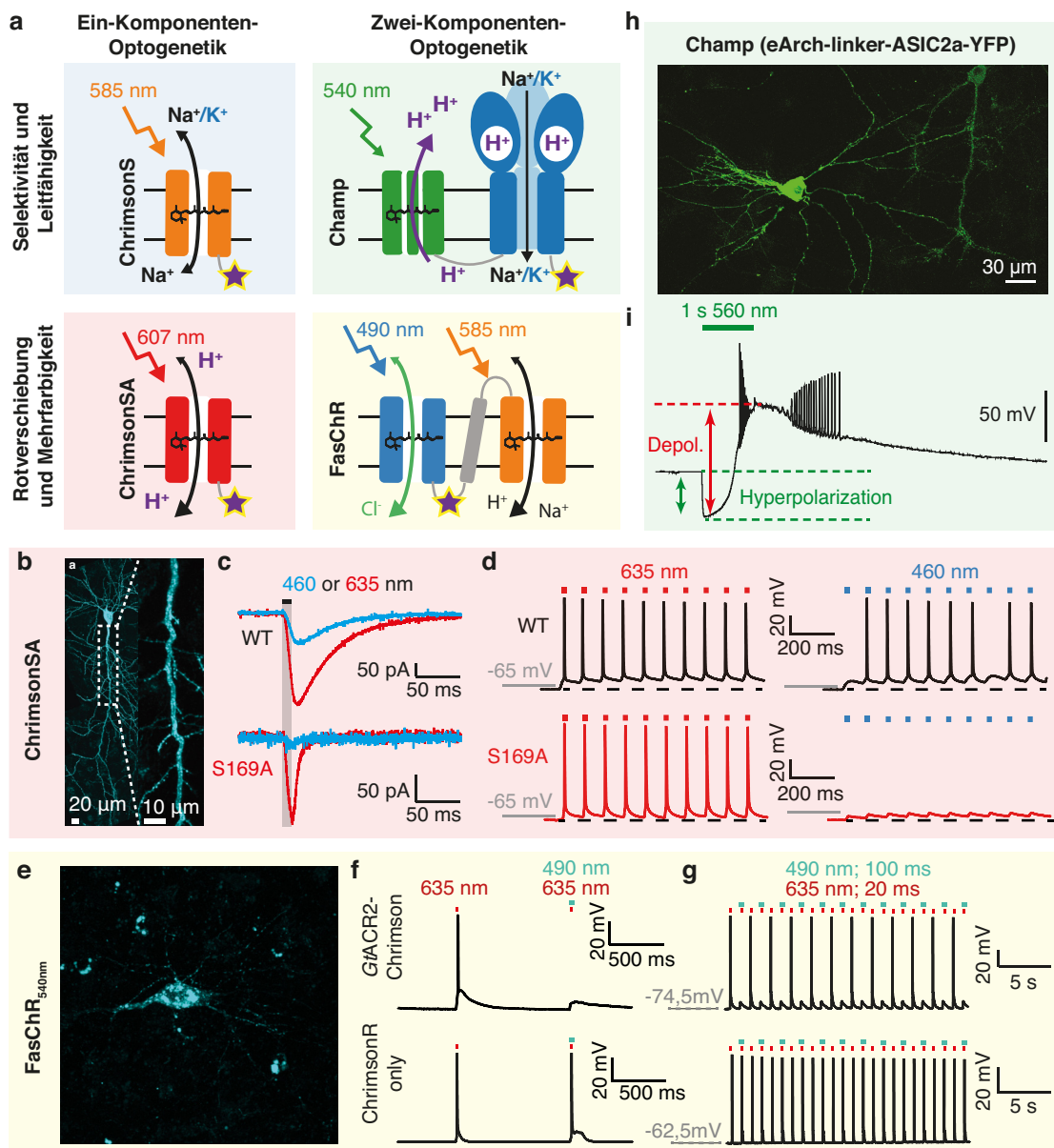


Abbildung 5.7: Optogenetische Werkzeuge (a) Cartoon in dieser Arbeit entwickelter optogenetischer Werkzeuge mit erhöhter Na⁺-Selektivität (ChrimsonS, oben links) und Leitfähigkeit (Champ3.0, oben rechts) sowie rotverschobener Absorption (ChrimsonSA, unten links) und reduzierter Blaulichtaktivität (FasChR, unten rechts) mit Ein- oder Zwei-Komponenten-Architektur. (b) Expression von CsChrimsonSA-mCerulean in CA1 pyramidalen Neuronen im Hippocampuschnitt der Ratte visualisiert durch Zwei-Photonen-Mikroskopie [Oda et al., 2018]. (c) Repräsentative Photoströme von CsChrimson WT und CsChrimsonSA in (b) nach Anregung mit 460 nm (blau) und 635 nm (rot) mit 1 mW/mm². (d) Aktionspotentiale ausgelöst durch CsChrimson WT und CsChrimsonSA in pyramidalen Neuronen bei Grenzwertlichtintensitäten von 0,5 mW/mm² für den WT und 5 mW/mm² für S169A. (e) Expression von GfACR2-ts-mCerulean-βHK-Chrimson (FasChR_{540nm}) in CA1 pyramidalen Neuronen eines Rattenhippocampuschnittes, visualisiert wie (b). (f + g) Aktionspotentiale von FasChR_{540nm} und Chrimson K176R (ChrimsonR) in (e) nach Anregung mit 635 nm (links) sowie gleichzeitiger Anregung mit 635 nm und 490 nm (rechts). (h) Expression von eArch-Asic2a-eYFP (Champ) in kultivierten Hippocampusneuronen von Ratten. (i) Repräsentative Membranpotentialänderung eines Champ exprimierenden Neurons bei Anregung mit 560 nm. Daten in (b)-(g) wurden gemessen, ausgewertet und bereitgestellt von Silvia Rodriguez-Rozada und sind für (b)-(d) publiziert in [Oda et al., 2018]. Daten in (h)-(i) wurden gemessen und ausgewertet von Emily A. Ferenczi, PhD und sind publiziert in [Ferenczi et al., 2016].

son(E143)S) leitet bei neutralem pH-Wert zu mehr als 80% Na⁺-Ionen und übertrifft in seiner Natriumspezifität andere rotlichtaktivierbare ChRs wie ReaChR und C1V1. In Neuronen könnte dies eine stabilere Photostromantwort garantieren und eine intrazelluläre pH-Wert-Änderung wesentlich hinauszögern.

Das bei 607 nm aktivierte ChrimsonSA (für Chrimson S(uper red shifted and)A(ccelerated kinetics) bzw. Chrimson S(169)A) zeigt eine gute Expression in neuronalen Schnitten des Rattenhippocampus [Oda et al., 2018] (Abb. 5.7 b). Gleichzeitig ist auch in Neuronen die Photostromkinetik beschleunigt und die Blaulichtsensitivität reduziert (Abb. 5.7 c). Aufgrund der kürzeren Öffnungszeit von ChrimsonSA wird auch für dieses der Protoneneinstrom reduziert. Gleichzeitig wird die Repolarisation zum Ende ein Aktionspotentials beschleunigt (Abb. 5.7 d), welches sich in seinem Verlauf dadurch nicht mehr von einem elektrischen ausgelöstem Aktionspotential in Hippocampusneuronen unterscheidet [Oda et al., 2018]. Den optogenetischen bedeutendsten Vorteil von ChrimsonSA stellt die reduzierte Blaulichtaktivität dar, welche das spektrale Fenster für die Kombination mit weiteren blaulichtaktivierten optogenetischen Aktuatoren und Sensoren erweitert.

5.8.3 Zwei-Komponenten-Optogenetik: Fusionierte lichtaktivierte Ionenkanäle zur Aktivierung und Inhibition

Ein Zwei-Komponenten-System durch Fusion eines rotlichtaktivierten Kationkanals mit einem blaulichtaktivierten Anionkanal ermöglicht es darüber hinaus, das Auslösen von Aktionspotentialen bei zusätzlicher blauer Belichtung vollständig zu unterbinden (Abb. 5.7 e bis g). Der Auswärtsstrom des Chloridkanals kompensiert hierbei die in allen kationleitenden ChRs verbleibende Blaulichtaktivität (β -Banden). Eine Kombination kationleitender ChRs mit verschiedenen Ionenpumpen wurde mit fast gleicher Architektur ursprünglich von Kleinlogel et al. entworfen [Kleinlogel et al., 2011b]. Aufgrund einer stöchiometrischen Kopplung von absorbiertem Photon und transportierter Ladung waren die Photoströme der lichtgetriebenen Pumpen zehnfach kleiner als die Ströme des ChRs und erwiesen sich auch in dieser Arbeit in der Kombination von Chrimson und der hypsochrom verschobenen Arch3.0-Mutante M128A/S151A/A225T [Sudo et al., 2013] als nicht ausreichend, die Blaulichtaktivität von Chrimson bei negativen Spannungen zu kompensieren (Daten nicht gezeigt). Für die Kombination von kation- und anionleitenden ChRs (hier kurz als FasChR bezeichnet für „Fused activating/silencing ChRs“), sind die Photostromamplituden beider Proteine bei Spannungen nahe des Ruhepotentials von Neuronen hingegen vergleichbar. Je nach Chrimson/Anionkanal-Kombination ergaben sich bei negativer Spannung unterschiedliche Umkehrwellenlängen, welche den spektralen Bereich, in welchem Aktionspotentiale ausgelöst werden können, verschieden begrenzen.

Durch unterschiedliche Anregungswellenlängen können weiterhin Anionen- und Protonenströme zu unterschiedlichen Anteilen aktiviert werden, wodurch aufgrund der unterschiedlichen Nernstpotentiale beider Ladungsträger lokal definiert ein bestimmtes Membranpotential festgelegt werden kann. Die Verwendung verschiedener mikrobieller Rhodopsin für eine lokale, optische Spannungsklemme wurde als Kombination von ChRs und Ionenpumpen auch von Kleinlogel et al. vor-

geschlagen und als „OptoClamp“ durch eine Koexpression von *CrChR2* und *NpHR3.0* [Newman et al., 2015] in Neuronen umgesetzt. In den hier vorgestellten FasChR-Konstrukten ermöglicht es hingegen die Verwendung eines Chloridkanals, die Membranspannung nahe des Umkehrpotentials von Cl^- zu klemmen ohne das Cl^- -Ionen aktiv transportiert werden müssen. *GtACR1/2* [Govorunova et al., 2015] und Chrimson sind aufgrund der geringen Inaktivierung ihres Photostroms für die optische Spannungsklemme besonders geeignet.

Als dritte potentielle Anwendung entkoppeln die präsentierten FasChR-Konstrukte das elektrische Signal von den Flüssen der geleiteten Ladungsträger. Während sich nahe der Umkehrwellenlänge der Chloridauswärtsstrom und der Protoneneinstrom gegenseitig ausgleichen und kein Nettophotostrom mehr gemessen werden kann, fließen trotzdem Protonen in die Zelle hinein und Chloridionen aus der Zelle heraus. Durch den Austausch von Chrimson durch ein Ca^{2+} -leitendes ChR könnte somit in Zukunft beispielsweise ein FasChR-Konstrukt entwickelt werden, welches eine Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ermöglicht, ohne gleichzeitig das Membranpotential zu ändern.

Unter physiologischen Bedingungen kann die intrazelluläre Chloridkonzentration im Axon höher sein als im Zellkörper und zu unterschiedlichen Umkehrpotentialen für Chlorid in verschiedenen Zellkompartimenten führen [Mahn et al., 2018]. Für eine stabile und verlässliche Photostromantwort in neuronalen Anwendungen könnte es entsprechend von Vorteil sein, die hier vorgestellten FasChR-Konstrukte vorwiegend im Soma der Zelle zu exprimieren. Verschiedene Lokalisationssequenzen wurden hierfür bereits erfolgreich an anderen ChRs erprobt [Mahn et al., 2018, Shemesh et al., 2017]. Da sowohl Chrimson [Oda et al., 2018] als auch *GtACR1* [Kim et al., 2018, Li et al., 2019] Homodimere bilden, könnte es bei einer Expression der Tandemkonstrukte zur Ausbildung von Proteinnetzwerken in der Membran kommen. Zur Verbesserung der Expression könnten alternative Proteinlinker sowie Mutationen entlang der Dimerinteraktionsfläche der verwendeten ChRs erwogen werden.

5.8.4 Zwei-Komponenten-Optogenetik: Protonenpumpe und Kanal

Zur Erschließung neuer optogenetischer Funktionalitäten können ligandenaktivierte Ionenkanäle durch lichtinduzierte Konzentrationsänderungen eines sekundären Botenstoffes aktiviert werden. Nahezu gleichzeitig wurden von drei unabhängigen Arbeitsgruppen Licht induzierte lokale Protonenkonzentrationsänderungen in Oozyten, CHO Zellen, HEK293-Zellen und Neuronen zur Aktivierung pH-aktivierter Ionenkanäle getestet [Ferenczi et al., 2016, Li et al., 2014b, Zeng et al., 2015].

Als Zwei-Komponenten-System wurden die Protonenpumpen *CsR_{T46}*, Arch, ArchT oder eArch als Lichtsensor und die protonenaktivierten Ionenkanäle *Asic1a*, *Asic2a*, *Asic3*, *GlicT* und *GlicGlyR* in dieser Arbeit, *Asic1a*, *Asic2a* und *Asic3* von Zeng et al. [2015], *Asic1a* von Li et al. [2014b] und *Asic2a* von Ferenczi et al. [2016] als zelluläre Effektoren verwendet. Die einfache Koexpression einer Protonenpumpe und eines protonenaktivierten Ionenkanals in *Xenopus laevis* ermöglichte es, lichtinduziert Kation-, Natrium- und Chloridströme in Oozyten zu aktivieren. Je nach extrazellulärer H^+ -Puffer-Konzentration konnten oberflächennahe pH-Werte von 6,1 -

7,4 durch die lichtgetriebene Protonenpumpe eingestellt werden. Die lichtinduzierte Öffnung des Ionenkanals wird durch dessen Dosis-Wirkungskurve bestimmt und war bei niedriger Pufferkonzentration von 0,1 - 1,0 mM MOPS für Kanäle mit geringer Inaktivierung wie Asic2a, GlicT und GlicGlyR hoch reproduzierbar. Die bei konstanter Perfusion sogar beschleunigte Kanalaktivierung legte eine oberflächennahe Weiterleitung auswärtsgepumpter Protonen zum pH-Sensor der Kanäle nahe. In *Xenopus laevis* Oozyten könnte die Invagination der Zelloberfläche die Ausbildung räumlich begrenzter, diffusionslimitierter Mikro-Umgebungen fördern und eine lokale Ansäuerung begünstigen [Baburin et al., 2006, Goldin, 2006]. Gleichzeitig könnten Protonen direkt an der Membranoberfläche entlang diffundieren, von welche sie erst verzögert an das extrazelluläre Medium abgegeben werden [Heberle et al., 1994]. Die extrazelluläre Pufferkapazität bestimmt hierbei sowohl die Menge zur Ansäuerung eines bestimmten Volumens benötigter Protonen als auch die Protonendissoziationsrate von der Membran und damit die Größe und Reichweite lokaler pH-Änderung an der Membranoberfläche. Mit Hilfe eines membrangebundenen optogenetischen Fluoreszenzsensors konnte in HEK-Zellen eine Abhängigkeit der Oberflächen-pH-Änderung von der Entfernung zur Protonenquelle bestätigt werden, welche durch eine Erhöhung der Anzahl exprimierte Protonenpumpen kompensiert werden kann. Eine effiziente Kanalaktivierung wird entsprechend sowohl durch die Anzahl membranständiger Protonenpumpen als auch deren räumliche Nähe zum Kanal gefördert.

Auf der Oberfläche von HEK-Zellen war die hier nach CsR_{T46N} -Aktivierung beobachtete extrazelluläre Ansäuerung mit $\Delta pH \sim 0,2$ klein (1 mM HEPES), stimmt jedoch im Betrag hervorragend mit der von Li et al. [2014b] mit Hilfe einer pH-Mikroelektrode gemessenen pH-Änderung an der Oberfläche von ArchT-exprimierenden CHO-Zellen überein. Insbesondere in den Zellzwischenräumen scheinen jedoch im HEK293-Zellverbund auch größerer extrazelluläre pH-Wert-Änderung möglich zu sein [Zeng et al., 2015]. Genau wie in *Xenopus laevis* Oozyten konnten somit auch in CHO-Zellen und HEK-Zellen ASIC Ströme durch eine koexprimierte Protonenpumpe aktiviert werden [Li et al., 2014b, Zeng et al., 2015]. Im Vergleich zu Asic1a und Asic3 waren die Photoströme von Asic2a hierbei klein [Zeng et al., 2015], was durch die im Vergleich zu Oozyten geringere extrazelluläre pH-Wert-Änderung in Säugetierzellen sowie die verglichen zu Asic1 und Asic3 geringere Protonenaffinität des Asic2a Kanals erklärt werden kann [Zhang and Canessa, 2002]. Nichtsdestotrotz konnten auch in pyramidalen Neuronen - sowohl in Kultur [Ferenczi et al., 2016] als auch in Schnitten des visuellen Kortex von Mäusen [Li et al., 2014b] - lichtinduzierte ASIC-Ströme hervorgerufen werden, welche sogar hinreichend groß waren, Abfolgen von Aktionspotentialen auszulösen. Im visuellen Kortex konnten endogene ASIC1a Kanäle sogar durch das in benachbarten Astrozyten exprimierte ArchT über den extrazellulären Raum hinweg aktiviert werden [Li et al., 2014b]. In pyramidalen Zellen des Hippocampus führte hingegen die Aktivierung von eArch nur bei reduzierter Pufferkapazität des extrazellulären Mediums zu Asic-ähnlichen Einwärtsströmen in benachbarten Zellen (als „Bystander“ bezeichnet), wohingegen es unter Standardbedingungen zu einer Inaktivierung von Asic-Kanälen in benachbarten Neuronen kam [Ferenczi et al., 2016]. Wurden hingegen eArch und Asic2a im selben Neuron überexprimiert, konnten Asic2a-Kanäle auch unter Standardbedingungen in hippocampalen Neuronen lichtinduziert geöffnet werden [Ferenczi et al., 2016]. Die Kanalöffnung wurde hierbei durch eine

kovalente Fusion von Kanal und Pumpe gefördert, kurz als Champ für „**Channel and Pump**“ bezeichnet, mit einer höheren Aktivierungseffizienz bei kürzerer Linkerlänge (Abb. 5.7 h und i). Obwohl auch für das Fusionskonstrukt in Neuronen eine stärkere ASIC-Aktivierung bei niedrigerer extrazellulärer Pufferkapazität von 0,1 mM HEPES erzielt wurde, war in 25 mM HEPES insbesondere die Inaktivierung des lichtaktivierten Asic2a-Stroms reduziert und Einwärtsphotoströme auch bei längerer Belichtung in ihrer Amplitude konstant. Auch im neuronalen Kontext scheint somit die Aktivierung pH-sensitiver Ionenkanäle durch lichtaktivierte Protonenpumpen durch die Ausbildung von lokalen Protonenmikrodomänen bestimmt zu werden, welche durch ein Wechselspiel der Protonendiffusion entlang der Membranoberfläche und der Ansäuerung lokaler Volumina gebildet werden und deren Ausdehnung durch die Dichte transportierter Protonen, die Geometrie des extrazellulären Raums und die Pufferkapazität des extrazellulären Mediums bestimmt wird und sich entlang der Membranoberfläche, oder bis hin zur benachbarten Zelle, erstrecken kann [Ferenczi et al., 2016]. Im synaptischen Spalt sind lokale pH-Wert-Änderungen nach Vesikelfreisetzung auch an der synaptischen Signalübertragung beteiligt und zusammen mit ASIC-Kanälen für die synaptische Plastizität in der Amygdala von Bedeutung [Du et al., 2014].

Als wesentliche Einschränkung protonengekoppelter Zwei-Komponenten-Systeme erwies sich deren hohe Zellvariabilität unter natürlichen Pufferbedingungen. Entsprechend zeigten in kultivierten Neuronen nur 50-60% der Champ2.0¹⁹-exprimierenden Zellen einwärtsgerichtete Asic2a-Ströme [Ferenczi et al., 2016]. Im visuellen Mäusekortex konnten in nur 68% der die ArchT exprimierenden Glia-Zellen umgebenden pyramidalen Neuronen lichtinduzierte Aktionspotentiale ausgelöst werden [Li et al., 2014b]. Und selbst in HEK293 Zellen zeigte ein Fusionskonstrukt aus Arch und Asic1a nur in 70% der Zellen Einwärtsströme [Zeng et al., 2015]. Die hohe Zellvariabilität könnte den vielseitigen Anforderungen zur Ausbildung von Protonenmikrodomänen geschuldet sein. Gleichzeitig könnte eine unterschiedliche Oligomerisierung mit endogenen ASIC-Kanälen die pharmakologischen Eigenschaften des Kanals verändern und die Dosiswirkungskurve der Kanäle verschieben [Babinski et al., 2000]. Insbesondere in Neuronen könnte sich schließlich auch die zelluläre Lokalisation des Konstruktes in verschiedenen Zellen unterscheiden und für große Unterschiede der Asic-Aktivierung in verschiedenen Zellen verantwortlich sein.

Zukünftige Anwendungen protonengekoppelter Zwei-Komponenten-Systeme könnten entsprechend durch die verbesserte Lokalisation von Champ in unterschiedliche Membran- oder subzelluläre Kompartimente die Zellvariabilität reduzieren und neue Anwendungsfelder erschließen. Im Endoplasmatischen Retikulum könnte zum Beispiel eine Kombination von CsR und dem protonenaktivierten TRPV1 Kanal [Aneiros et al., 2011] eine intrazelluläre Kalziumfreisetzung ermöglichen. Alternativ könnte das Zwei-Komponenten-Konzept durch andere, weniger stark gepufferte sekundäre Botenstoffe erweitert werden und anstelle der lokalen Protonenkonzentration die lokale Ca²⁺- oder cAMP-Konzentrationen durch Licht verändert werden, um alternative Ionenkanäle zu öffnen. Entsprechend konnten mit dem kalziumleitenden ChR Catch durch intrazellulär Ca²⁺-Konzentrationsänderungen BK Kanäle geöffnet werden [Mager et al., 2017]. Als Zwei-Komponenten-System der nächsten Generation wurde schließlich der prokaryotischen Ka-

¹⁹Champ2.0 und Champ3.0 unterscheiden sich ausschließlich in ihrer Linkerlänge mit 41 Aminosäuren für Champ2.0 und 23 Aminosäuren für Champ3.0 [Ferenczi et al., 2016].

liumkanal SthK1 durch die lösliche lichtaktivierte Adenylzyklase bPAC aktiviert [Beck et al., 2018] und erlaubte - fusioniert als lichtaktivierter cAMP-vermittelter Kaliumkanal - die Inhibition von Aktionspotentialen in Kardiomyozyten und lebenden Mäusen [Bernal Sierra et al., 2018].

5.9 Ausblick

Die Protonenselektivität von ChRs unterscheidet sich zwischen einzelnen Rhodopsinen und ist insbesondere für Chrimson und CsChR hoch (Abschnitt 5.4). Protonen werden delokalisiert durch protonierbare Reste entlang von Helix 2 selektiert, wobei der Beitrag konservierter Glutaminsäuren zur Protonenselektivität zwischen verschiedenen ChRs variiert. Wichtige molekulare Bestimmungsfaktoren der Protonenleitung konnten proteinübergreifend bestimmt sowie bezüglich einzelner Photozyklusintermediate spezifiziert werden. Der molekulare Prozess der Protonenleitung selbst ist jedoch weiterhin unklar. Entsprechend könnten E4' im Äußeren Tor von Chrimson sowie E3' im Zentralen Tor von CrChR2 während der Protonenleitung protoniert und deprotoniert werden und selbst Teil einer Protonentransferkette durch das Protein bilden oder auch als Wasserstoffbrückenbindungspartner eine membrandurchspannende Wasserkette stabilisieren, über welche anstelle dessen die Protonenleitung erfolgen könnte. Auch für H⁺Hv1 werden weiterhin sowohl eine Protonenleitung über die selektivitätsbestimmende Asparaginsäure D112 als auch entlang einer Kette „gefrorener Wasser“ diskutiert [Bennett and Ramsey, 2017, DeCoursey, 2017]. Die Hypothese einer transienten Protonierung einzelner Seitengruppen während der Protonenleitung könnte für ChRs durch die Messungen der Isotopen- und Temperaturabhängigkeit des Protonenstroms geklärt werden. Sowohl in deuteriertem Wasser als auch bei niedriger Temperatur würde der Protonenstrom bei vorübergehender Bindung des Deuteriums oder Protons an die Carboxygruppen der an der Protonenweiterleitung beteiligten Glutaminsäuren [Barbara Schowen and Schowen, 1982] stärker abnehmen als bei der Weiterleitung entlang einer Wasserkette [DeCoursey, 2017]. Synchronisierte Photostrommessungen nach Laseranregung könnten hierbei gemeinsam mit einer kinetischen Modellierung des Photostromverlaufes helfen, Isotopen- und Temperatureffekte auf Protonenleitung und Photostromkinetik zu separieren.

Unterschiedliche Mechanismen der Protonenleitung könnten auch durch die molekulare Struktur der leitenden Zustände unterschieden werden. Zeitaufgelöste Röntgenkristallstrukturmessungen mit Hilfe eines freien Elektronen-Lasers könnten in Zukunft - analog zu BR [Nango et al., 2016, Nogly et al., 2018] - helfen, frühe Photozyklusübergänge strukturebiologisch darzustellen. In protonenselektiven ChRs wie Chrimson könnten Strukturänderungen während des Photozyklus klein sein und in Anbetracht der räumlichen Einschränkungen des Proteinkristalls längere Messungen bis hin zu den späten leitenden Zuständen ermöglichen. Alternativ könnte auch die Proteinstruktur des Offenzustandes durch die Kristallisation langsamer Mutanten gewonnen werden. In Chrimson ist M201 weder Bestandteil der ionenleitenden Pore noch in strukturbestimmenden interhelikalen Wechselwirkungen involviert und führt substituiert zu einer dramatischen Verlangsamung der Photostromkinetik ohne die Protonenselektivität zu reduzieren (Abschnitt 5.6.2 und 5.5), weshalb M201-Mutanten zur Strukturbestimmung des Offenzustandes von Chrimson geeignet sein könnten.

Das rotverschobene Chrimson ähnelt aufgrund des protonierten Ci1 und einer zu BR ähnlichen Retinalbindetasche der blauen Form von BR (Abschnitt 5.1.3 und 5.3.1). Während das „Blaue BR“ aufgrund des protonierten Ci1 keinen aktiven Protonentransport mehr ermöglicht [Subramaniam et al., 1990], können in Chrimson Photoströme für unterschiedliche Photozyklusintermediate gemessen werden. Im Gegensatz zu einem aktiven Protonentransport ist für die Ausbildung einer ionenleitenden Pore keine Deprotonierung der RSBH⁺ erforderlich und ursprünglich aus wissenschaftlicher Neugierde untersuchte Photozyklusübergänge gewinnen in Chrimson funktionale und in der optogenetischen Anwendung sogar medizinische Relevanz. Chrimson bündelt schließlich Strukturmerkmale von ChRs entlang der ionenleitenden Pore (Abschnitt 5.5) und von BR in der Retinalumgebung (Abschnitt 5.1.3) und könnte als funktionale Zwischenform von Protonenpumpen und ChRs helfen, mechanistische Konzepte von Protonenpumpen auf ChRs zu übertragen. Verschiedene in dieser Arbeit auf Grundlage der Photoströme entwickelte Hypothesen bezüglich der Porenöffnung durch einen Protonierungswechsel des Gegenions (Abschnitt 5.3.2) und ein Einwärtsklappen von R162 (Abschnitt 5.4.4), der Licht/Dunkeladaptation durch alternative Retinalisomerisierungen (Abschnitt 5.3.4) sowie der Ausbildung eines nicht vollständig geschlossenen Q-Zustandes (Abschnitt 5.3.5) können in Zukunft spektroskopisch überprüft und erweitert werden.

Durch rationales Design wurden schließlich verschiedene optogenetische Werkzeuge von einfachen Chrimson-Mutanten (Abschnitt 5.8.2) bis hin zu lichtaktivierten Zwei-Komponenten-Systemen (Abschnitt 5.8.4) entwickelt. ChrimsonS stellt den ersten rotlichtaktivierten Na⁺-Kanal und ChrimsonSA das zur Zeit am weitesten rotverschobene ChR dar. Übertragen auf andere ChRs wird eine Reduktion der Protonenselektivität die Entwicklung von weiterhin gefragten kalzium- und kaliumselektiven ChRs fördern. Substitutionen an der Position von S169 könnten weiterhin auch in anderen mikrobielle Rhodopsinen mit neutralem Ci1 die Absorption - wie in Chrimson - rotverschieben. Die geringen Photostromdichten von ChrimsonS und ChrimsonSA können in Zukunft durch eine verbesserte Expression kompensiert oder durch die Identifizierung zusätzlicher Mutationen verbessert werden. Insbesondere Membranexpression und Photostromamplituden lassen sich in semi-automatisierten Hochdurchsatzverfahren mittels randomisierter Mutagenese und gerichteter Evolution, assistiert durch maschinelles Lernen und verschiedene Robotersysteme, gut optimieren [Bedbrook et al., 2017b, Cho et al., 2019, Piatkevich et al., 2018].

Im Schatten der Möglichkeiten optogenetischer Anwendungen bedarf der gezielte Einsatz eines optogenetischen Werkzeugs jedoch auch weiterhin dessen detaillierten funktionalen Verständnisses. Aufgrund verschiedener leitender Zustände je nach Umgebung, Belichtungsfarbe und Belichtungshistorie ist in jedem Fall eine gründliche Charakterisierung notwendig. Weitere mikrobielle Rhodopsine könnten in Zukunft entdeckt und aufbauend auf den mechanistischen Erkenntnissen dieser Arbeit besser verstanden werden. Sollte sich schließlich Chrimson zur optogenetischen Behandlung der Netzhautdegenerationserkrankung *Retinitis pigmentosa* geeignet erweisen, so wären es am Ende Protonen, als die kleinsten Ladungsträger der Zelle, welche die Blinden wieder sehend machen.

A.1 Ergänzende Abbildungen

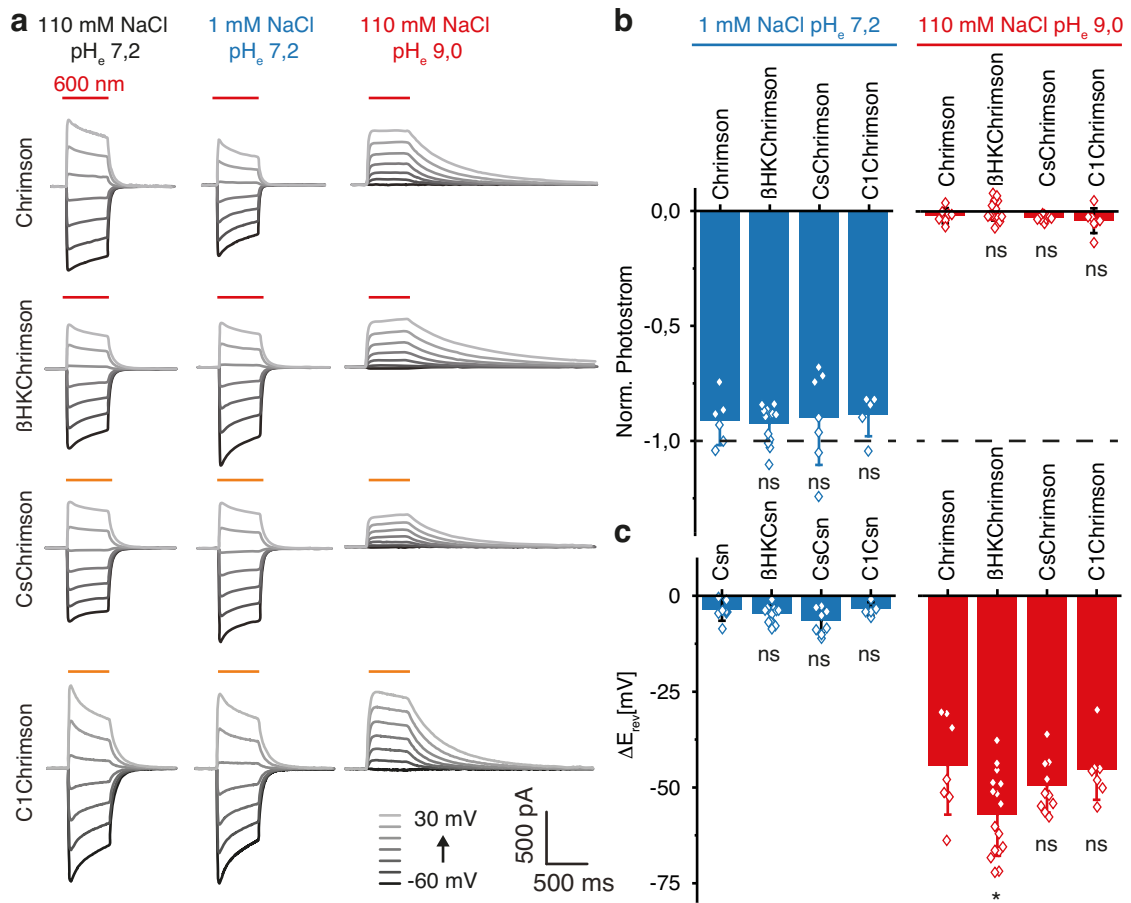


Abbildung A.1: Protonenselektivität N-terminal modifizierter Chrimsonvarianten (a) Repräsentative Photostromspuren N-terminaler Chrimsonchimären in extrazellulären Lösungen verschiedener Na⁺ und H⁺ Konzentration (Intrazellulär 110 mM NaCl, pH_i 7,2) (b) Normalisierte Photostromamplituden bei -60 mV nach Reduktion der extrazellulären Na⁺-Konzentration (links, blau) oder H⁺-Konzentration (rechts, rot). Die gestrichelte Linie markiert den Photostrom bei hoher und symmetrischer Na⁺- und H⁺-Konzentration. (c) Umkehrpotentialverschiebung nach Reduktion der extrazellulären Na⁺-Konzentration (links, blau) oder H⁺-Konzentration (rechts, rot). (M ± SD; verglichen zu WT)

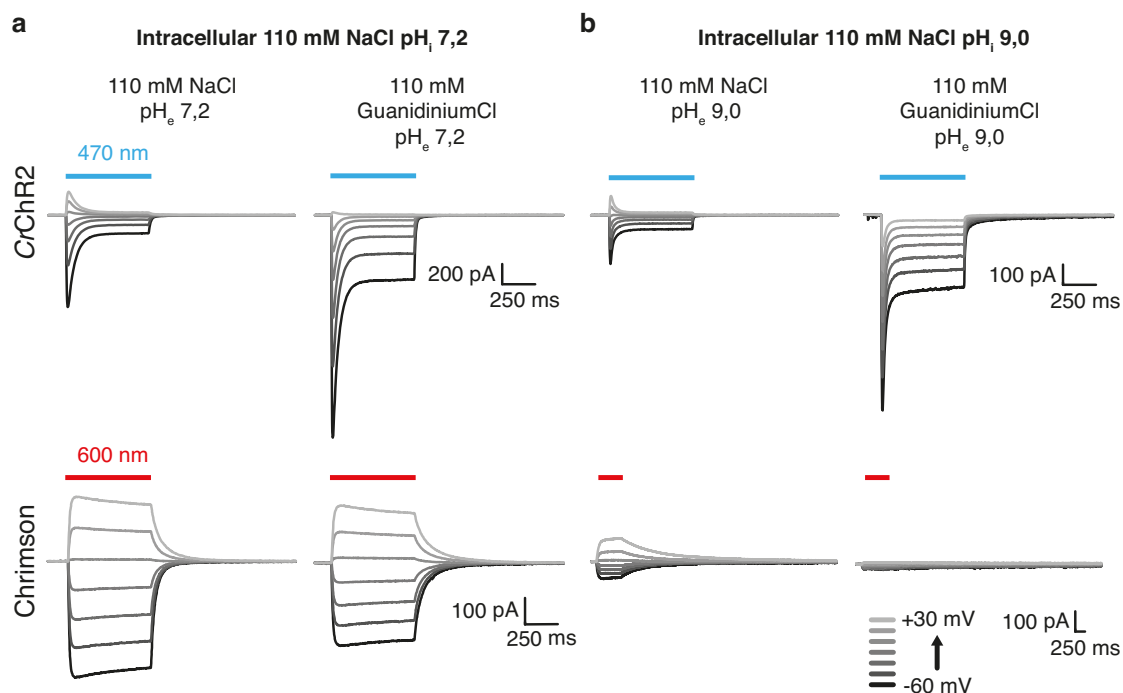


Abbildung A.2: Guanidiniumleitfähigkeit von CrChR2 und Chrimson (a) Repräsentative Photostromspuren von CrChR2 (oben) und Chrimson (unten) in 110 mM NaCl, pH_e7,2 (links) und 110 mM GuanidiniumCl, pH_e7,2 (rechts) mit intrazellulär 110 mM NaCl, pH_i7,2 (b) Repräsentative Photostromspuren von CrChR2 (oben) und Chrimson (unten) in 110 mM NaCl, pH_e9,0 (links) und 110 mM GuanidiniumCl, pH_e9,0 (rechts) mit intrazellulär 110 mM NaCl, pH_i9,0

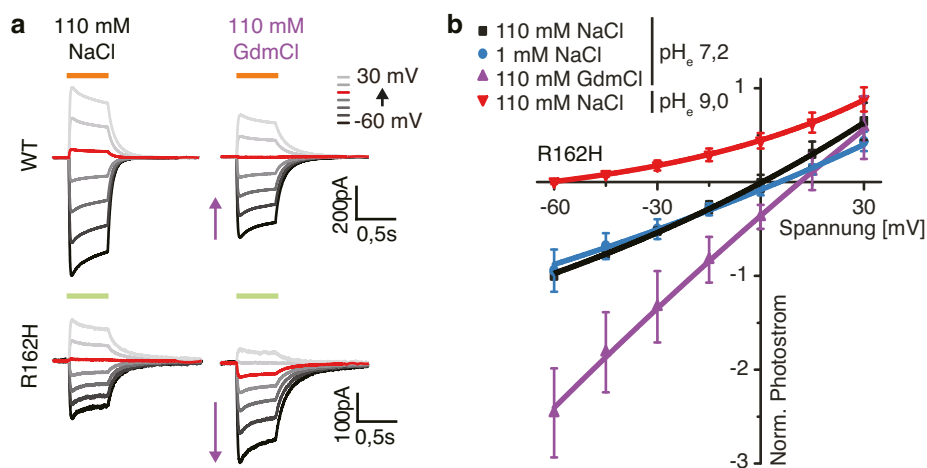


Abbildung A.3: Guanidiniumleitfähigkeit von Chrimson R162H (a) Repräsentative Photostromspuren von Chrimson WT (oben) und Chrimson R162H (unten) in 110 mM NaCl, pH_e7,2 (links) und 110 mM GuanidiniumCl, pH_e7,2 (rechts) mit intrazellulär 110 mM NaCl, pH_i7,2 (b) Strom-Spannungskurve von Chrimson mit den ionalen Bedingungen aus (a) und zusätzlich 1 mM NaCl, pH_e7,2 sowie 110 mM NaCl, pH_e9,0 (M±SD).

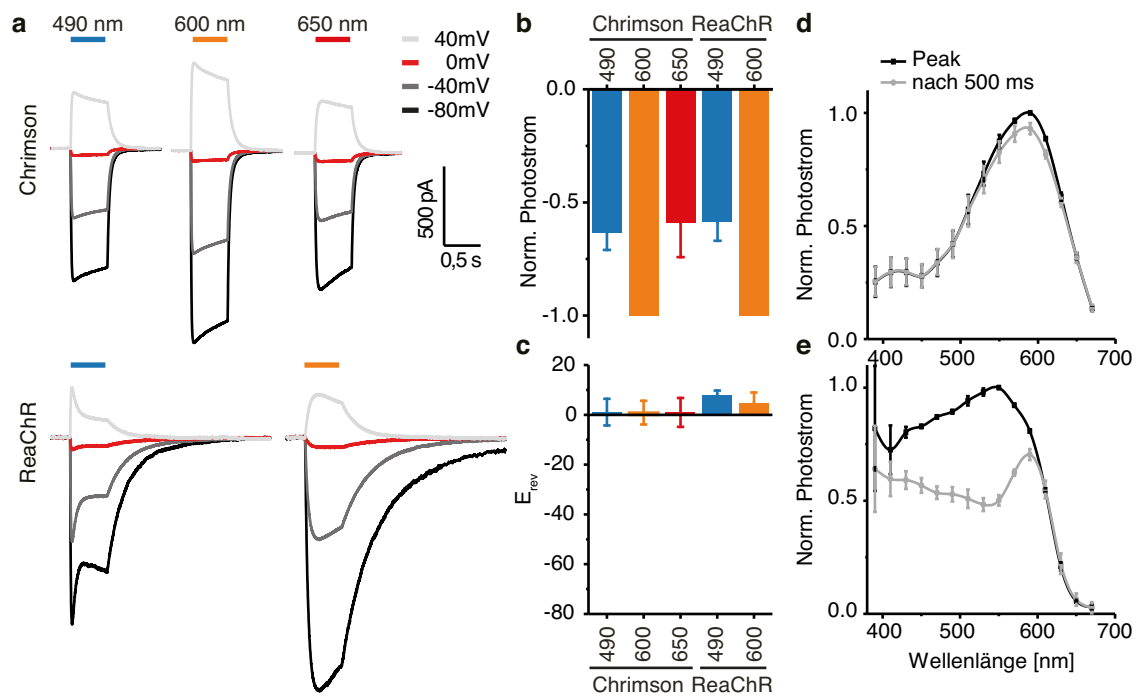


Abbildung A.4: Photoströme von Chrimson und ReaChR bei asymmetrischer Cl^- Konzentration und unterschiedlicher Belichtung (a) Repräsentative Photostromspuren von β HKChrimson WT (oben) und ReaChR WT (unten) bei Anregung mit 490 nm, 600 nm und 650 nm in extrazellulär 140 mM NaCl, pH_e 7,2 und intrazellulär 110 mM NaGluconat pH_i 7,2 **(b)** Normalisierter Photostrom (Peak) bei verschiedener Belichtung wie in (a). **(c)** Umkehrpotentiale bei verschiedener Belichtung wie in (a). **(d+e)** Aktionsspektren des maximalen (Peak) und späten (nach 500 ms) Photostrom von β HKChrimson (bei -60 mV) und ReaChR (bei -40 mV) in den Pufferbedingungen von (a). Im Gegensatz zu (a)-(c) wurde für die Aktionsspektren eine konstante Photonendichte bei den verschiedenen Wellenlängen eingestellt. Die Messungen (b)-(e) stellen $M \pm SD$ dar.

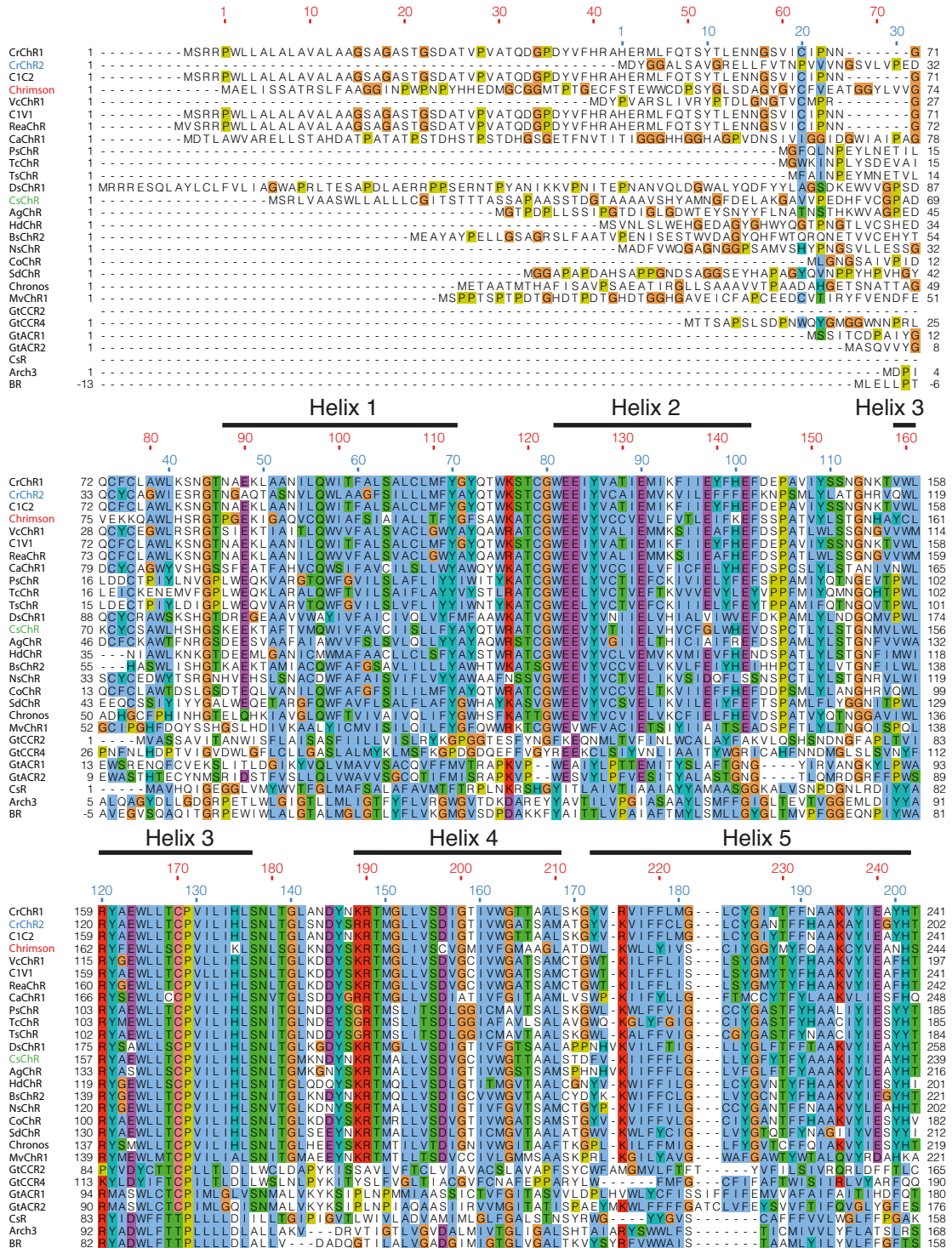


Abbildung A.5: Aminosäuresequenzvergleich verschiedener ChRs CrChR1 (XP_001699021), CrChR2 (XP_001701725), C1C2 (AHA49646), Chrimson (AHH02126), VcChR1 (ABZ9090), C1V1 (AEL28924), ReaChR (AGT48260), CaChR1 (AER58220), PsChR (AGF84747), TcChR (AHH02123), TsChR (AHH02155), DsChR1 (AEY68833), CsChR (AHH02144), AgChR (AHH02104), HdChR (AHH02125), BsChR2 (AHH02100), NsChR (AHH02120), CoChR (ATL14619), SdChR (AHH02138), Chronos (AHH02106), MvChR1 (AEI83869), GtCCR2 (ANC73518), GtCCR4 (ARQ20888), GtACR1 (APR74031), GtACR2 (APR74032), CsR (XP_005646688 oder AFI58111), Arch3 (WP_092921078), BR (WP_010903069). GenBank-Referenz in Klammern.

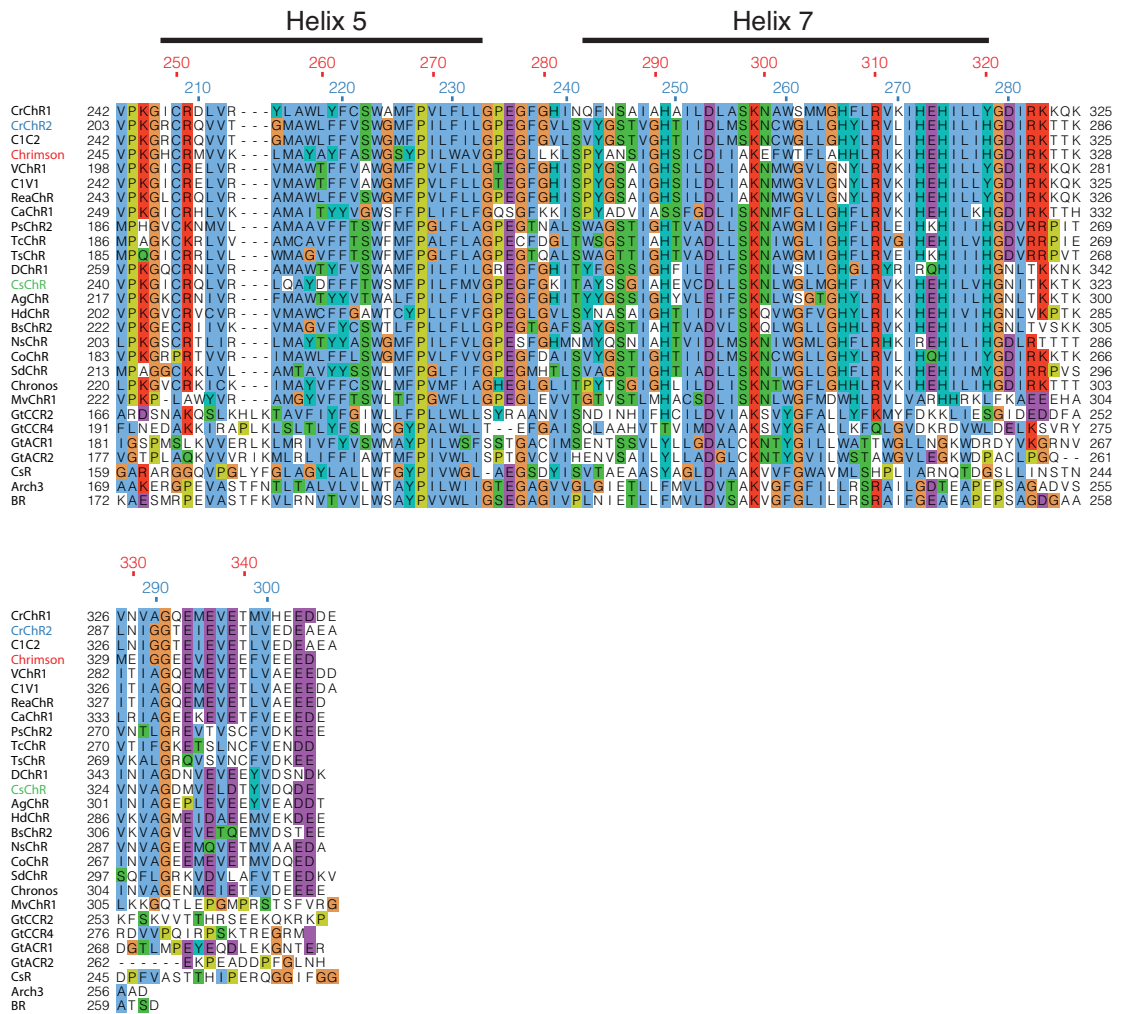


Abbildung A.5: Aminosäuresequenzvergleich verschiedener ChRs CrChR1 (XP_001699021), CrChR2 (XP_001701725), C1C2 (AHA49646), Chrimson (AHH02126), VcChR1 (ABZ90900), C1V1 (AEL28924), ReaChR (AGT48260), CaChR1 (AER58220), PsChR (AGF84747), TcChR (AHH02123), TsChR (AHH02155), DsChR1 (AEY68833), CsChR (AHH02144), AgChR (AHH02104), HdChR (AHH02125), BsChR2 (AHH02100), NsChR (AHH02120), CoChR (ATL14619), SdChR (AHH02138), Chronos (AHH02106), MvChR1 (AEI83869), GtCCR2 (ANC73518), GtCCR4 (ARQ20888), GtACR1 (APR74031), GtACR2 (APR74032), CsR (XP_005646688 oder AFI58111), Arch3 (WP_092921078), BR (WP_010903069). GenBank-Referenz in Klammern.

A.2 Ergänzende Daten

	ΔE_{rev} [mV]		
	1 mM NaCl, pH _e 7,2	110 mM NaCl, pH _e 9,0	$P_{\text{H}^+}/P_{\text{Na}^+} \times 10^6$
PsChR	-50±6 (5)	-8±3 (5)	0,43±0,18
CrChR2	-16±3 (9)	-22±5 (8)	2,2±0,3
C1C2	-13±1 (8)	-17±4 (9)	2,1±0,4
C1V1	-13±2 (9)	-22±4 (9)	2,5±0,1
ReaChR	-11±2 (9)	-34±4 (9)	4,1±1
Chrimson	-4±3 (6)	-44±13 (7)	10±1
CsChR	-2±2 (6)	-84±8 (7)	≥50

Tabelle A.1: Relative Protonenpermeabilität verschiedener Kanalrhodopsine: Für jede Umkehrpotentialverschiebung ausgehend von symmetrischen Ionenbedingung zu extrazellulär reduzierter Natriumkonzentration bei pH 7,2 (links) sowie extrazellulär reduzierter Protonenkonzentration zu pH_e 9,0 (mitte) wird die relative Protonenpermeabilität $P_{\text{H}^+}/P_{\text{Na}^+}$ berechnet und der Mittelwert beider Permeabilitäten gebildet sowie deren Differenz als Fehler angegeben (rechts). Die Umkehrpotentiale stellen Mittelwert und Standardabweichung dar mit der Anzahl der Messungen in Klammern.

	I_{peak} [pA/pF]	λ_{max} [nm]	$\tau_{\text{off,apparent}}$ [ms]		
			pH _e 7,2, -60 mV	pH _e 7,2, +30 mV	pH _e 9,0, +30 mV
Chrimson WT	75±10 (7)	584±1 (6)	32±9 (10)	60±20 (10)	670±90 (7)
βHKChrimson	80±50 (25)	588±1 (7)	31±10 (36)	60±20 (36)	800±280 (15)
CsChrimson	150±30 (7)	583±4 (10)	46±8 (18)	82±9 (18)	560±90 (12)
C1Chrimson	140±20 (6)	580±3 (7)	77±12 (10)	120±20 (10)	460±70 (7)

Tabelle A.2: Photostromdichte, Aktivierungswellenlänge und Kinetik von Chrimson Varianten: Photostromdichte bei maximaler Stromamplitude sowie Wellenlänge der maximalen Aktivierung bei 110 mM Na⁺, pH_{e,i} 7,2 und -60 mV. Außerdem apparente Schließkinetik des Photostroms bei -60 mV und 30 mV mit extrazellulär pH_e 7,2 oder pH_e 9,0. Alle Messungen stellen Mittelwert und Standardabweichung dar mit der Anzahl der Messungen in Klammern. Photostromdichten von Chrimson WT, CsChrimson und C1Chrimson wurden am selben Messtag gemessen.

	I_{peak} [pA/pF]	λ_{max} [nm]	$\tau_{\text{off,apparent}}$ [ms]		
			pH _e 7,2, -60 mV	pH _e 7,2, +30 mV	pH _e 9,0, +30 mV
WT	90±60 (15)	583±4 (10)	46±8 (18)	82±9 (18)	560±90 (12)
K91A	47±43 (3)	580±6 (3)	36±8 (3)	52±1 (3)	280±40 (2)
Q95A	79±41 (5)	585±1 (3)	42±16 (5)	67±20 (5)	260±80 (2)
Q98A	92±29 (2)	582±1 (2)	44±6 (2)	75±8 (2)	445±10 (2)
A105S	120±67 (16)	578±3 (7)	270±80 (13)	510±100 (15)	2100±500 (6)
E124A	68±37 (9)	579±3 (7)	310±50 (9)	800±300 (9)	4100±700 (6)
E125A	7±4 (10)	582±1 (5)	520±30 (9)	1480±240 (8)	6400±1700 (3)
E132A	36±19 (14)	560±7 (8)	55±10 (14)	56±13 (14)	450±250 (8)
E132Q	46±19 (4)	559±4 (4)	210±30 (4)	220±40 (3)	620±130 (2)
F135A	65±24 (18)	533±5 (15)	126±17 (18)	169±24 (18)	420±140 (14)
F135H	42±20 (5)	522±3 (6)	32±4 (5)	35±3 (5)	176±16 (3)
F135K	10±5 (18)	521±3 (11)	1390±180 (17)	1440±210 (19)	2000±300 (9)
F135Y	77±57 (8)	554±7 (7)	140±21 (8)	200±40 (8)	970±240 (6)
T137I	181±84 (3)	581±3 (3)	93±12 (3)	144±12 (3)	490±100 (3)
E139A	5±2 (11)	513±3 (6)	1700±300 (9)	410±160 (11)	370±150 (8)
E139D	17±11 (10)		390±100 (10)	340±70 (10)	730±190 (5)
E139H	5±3 (8)	522±5 (5)	6200±900 (7)	4700±400 (6)	3000±1000 (5)
E139Q	2±1 (8)	520±6 (5)	2600±1200 (8)	600±400 (6)	1000±900 (4)
K142A	97±30 (2)	577±3 (2)	77±13 (2)	130±30 (2)	490±80 (2)
E143A	5±3 (11)	589±5 (5)	101±22 (9)	41±22 (9)	70±60 (7)
E143D	10±8 (12)	562±7 (5)	100±30 (11)	100±40 (11)	510±70 (6)
E143Q	4±4 (8)	589±1 (5)	140±30 (7)	55±14 (7)	65±18 (7)
E143S	18±9 (11)	589±1 (6)	130±50 (10)	42±16 (10)	37±4 (5)
Y159A	24±10 (6)	544±2 (6)	101±15 (6)	150±20 (6)	270±100 (5)
Y159V	16±6 (7)	526±6 (7)	200±40 (7)	370±90 (7)	850±140 (6)
R162A	unfunktional				
R162H	7±2 (9)	553±2 (7)	133±11 (8)	220±40 (8)	410±40 (5)
R162K	13±5 (6)	533±5 (6)	410±120 (6)	440±140 (6)	670±160 (4)
E165A	5±2 (7)	563±4 (11)	85±23 (7)	90±20 (8)	150±20 (4)
E165D	8±6 (6)	571±1 (6)	100±50 (6)	150±110 (6)	250±30 (5)
E165Q	7±1 (5)	543±5 (5)	9±1 (3)	10±1 (5)	25±6 (5)
E165T	19±6 (6)	580±3 (5)	12±2 (6)	11±1 (6)	26±5 (2)
S169A	12±4 (9)	608±2 (7)	5±1 (10)	7±1 (9)	3100±1800 (6)
C170A	20±20 (9)	571±3 (8)	124±17 (9)	270±176 (8)	1400±500 (5)
C170D	3±2 (2)	573±2 (2)	93±13 (2)	100±3 (2)	
K176A	16±13 (8)	584±2 (7)	15±1 (8)	14±1 (8)	31±5 (6)
K176H	109±99 (10)	578±3 (7)	57±19 (9)	36±6 (8)	38±5 (5)
K176R	47±29 (14)	581±1 (5)	21±9 (7)	24±2 (5)	100±30 (6)
C198A	42±20 (6)	585±3 (6)	101±22 (6)	221±53 (6)	1510±170 (6)
C198D	2±2 (12)	581±4 (7)	13±2 (12)	13±1 (11)	19±3 (7)

Tabelle A.3: Photostromdichte, Aktivierungswellenlänge und Kinetiken von Chrimson Mutanten: Photostromdichte bei maximaler Stromamplitude sowie Wellenlänge der maximalen Aktivierung bei 110 mM Na⁺, pH_{e,i}7,2 und -60 mV. Ausserdem apparente Schließkinetik des Photostroms bei -60 mV und 30 mV mit extrazellulär pH_e7,2 oder pH_e9,0. Alle Messungen stellen Mittelwert und Standardabweichung dar mit der Anzahl der Messungen in Klammern.

	I_{peak} [pA/pF]	λ_{max} [nm]	$\tau_{\text{off,apparent}}$ [ms]		
			pH _e 7,2, -60 mV	pH _e 7,2, +30 mV	pH _e 9,0, +30 mV
WT	90±60 (15)	583±4 (10)	46±8 (18)	82±9 (18)	560±90 (12)
M201C	81±65 (2)	566±4 (5)	4700±400 (2)	6100±2300 (2)	
M201T	79±61 (6)	560±7 (7)	5000±3000 (6)	6000±4000 (6)	7000±6000 (3)
M201Q	47±19 (4)	569±12 (5)	1880±210 (4)	3090±180 (4)	
M201N	155±84 (5)	546±6 (6)	1700±800 (5)	2100±300 (5)	10000±3000 (3)
W217A	48±16 (2)	583±2 (2)	88±0.2 (2)	136±5 (2)	
Y220F	188±43 (6)	583±2 (6)	111±14 (6)	210±70 (6)	710±200 (4)
S223G	118±51 (6)	574±5 (6)	100±11 (6)	169±22 (6)	960±210 (4)
M230T	30±13 (5)	580±3 (5)	40±6 (5)	56±10 (5)	230±60 (2)
Y231F	77±58 (6)	574±3 (5)	101±7 (4)	170±30 (5)	760±140 (5)
Y268F	30±15 (6)	572±2 (8)	42±4 (6)	48±3 (5)	121±6 (5)
W272F	133±54 (6)	581±3 (6)	64±13 (6)	110±30 (6)	520±130 (4)
E277A	6±4 (7)	515±9 (7)	260±170 (6)	470±220 (6)	1690±230 (3)
N287A	52±16 (8)	575±3 (5)	147±23 (8)	180±24 (8)	460±50 (4)
N287E	6±4 (8)	553±10 (6)	190±90 (7)	220±30 (8)	380±80 (3)
C294A	76±18 (3)	581±1 (4)	37±2 (3)	60±5 (3)	292±13 (3)
C294L	100±6 (2)	583±1 (3)	13±0 (2)	20±1 (2)	158±11 (2)
D295A	3±2 (5)	522±6 (7)	3400±400 (5)	3300±1000 (5)	3500±400 (4)
D295N	5±2 (6)	529±4 (7)	1700±600 (6)	1900±600 (6)	2100±300 (3)
D295E	12±9 (8)	537±7 (6)	700±400 (8)	700±100 (6)	1000±200 (6)
A298S	48±15 (6)	570±3 (6)	35±3 (6)	40±5 (6)	145±9 (2)
E300A	69±59 (8)	558±13 (5)	830±170 (8)	2000±500 (8)	6100±2600 (5)
E300D	68±34 (3)	537±2 (2)	1150±120 (3)	2200±1000 (3)	
E300N	47±19 (10)	562±6 (8)	3400±700 (10)	5000±600 (10)	11000±4000 (6)
R310A	57±39 (5)	585±3 (5)	19±4 (5)	22±3 (5)	54±10 (4)

Tabelle A.3: Photostromdichte, Aktivierungswellenlänge und Kinetiken von Chrimson Mutanten (Fortsetzung): Photostromdichte bei maximaler Stromamplitude sowie Wellenlänge der maximalen Aktivierung bei 110 mM Na⁺, pH_{e,i} 7,2 und -60 mV. Ausserdem apparente Schließkinetik des Photostroms bei -60 mV und 30 mV mit extrazellulär pH_e 7,2 oder pH_e 9,0. Alle Messungen stellen Mittelwert und Standardabweichung dar mit der Anzahl der Messungen in Klammern.

	Norm. Photostrom (−60 mV)		ΔE_{rev}	
	110 mM NaCl pHe9,0	1 mM NaCl pHe7,2	110 mM NaCl pHe9,0	1 mM NaCl pHe7,2
WT	-0,028±0,012 (10)	-0,93±0,24 (8)	-50±7 (10)	-6±3 (8)
K91A	-0,047±0,004 (2)		-32±11 (2)	
Q95A	-0,036±0,001 (2)		-41,4±0,6 (2)	
Q98A	-0,02±0,01 (2)		-42±13 (2)	
A105S	-0,045±0,011 (8)	-1,18±0,03 (2)	-29±8 (8)	-3±2 (2)
E124A	-0,02±0,021 (6)	-0,88±0,18 (6)	-44±10 (6)	-8,3±1 (6)
E125A	-0,17±0,05 (7)	-0,88±0,12 (5)	-30±9 (7)	-8±4 (5)
E132A	-0,03±0,05 (8)	-0,99±0,17 (5)	-43±7 (8)	-4,2±1,4 (5)
E132Q	-0,073±0,004 (2)		-39±7 (2)	
F135A	-0,028±0,013 (11)	-0,97±0,07 (5)	-46±6 (11)	-1,6±1,6 (5)
F135H	-0,054±0,053 (3)	-1,16±0,05 (3)	-40±10 (3)	-1±3 (3)
F135K	-0,42±0,13 (11)	-0,99±0,18 (6)	-36±6 (11)	-5,4±2,3 (6)
F135Y	-0,17±0,09 (6)		-39±9 (6)	
T137I	-0,056±0,024 (3)		-37±12 (3)	
E139A	-1±0,19 (8)	-0,39±0,08 (5)	-18±5 (8)	-22,5±0,8 (5)
E139D	-0,08±0,04 (6)	-1±0,18 (6)	-34±4 (6)	-4±3 (6)
E139H	-0,14±0,09 (5)	-0,89±0,19 (6)	-43±6 (5)	-3±3 (6)
E139Q	-0,7±0,18 (7)	-0,7±0,1 (8)	-34±10 (7)	-12±4 (8)
K142A	-0,036±0,017 (2)		-31±14 (2)	
E143A	-1,29±0,19 (9)	-0,27±0,03 (6)	-8±4 (9)	-35,5±1,6 (6)
E143D	-0,02±0,05 (6)	-0,61±0,19 (7)	-43±5 (6)	-3,5±1,9 (7)
E143Q	-1,16±0,22 (7)	-0,5±0,14 (6)	-7±5 (7)	-35±6 (6)
E143S	-1,04±0,12 (6)	-0,17±0,03 (6)	-6,8±1,4 (6)	-36±2 (6)
Y159A	0,002±0,013 (6)	-1,03±0,07 (4)	-59±7 (6)	0,7±1,6 (4)
Y159V	-0,029±0,013 (6)	-0,87±0,12 (7)	-47±2 (6)	-2,38±1,3 (7)
R162H	0,003±0,025 (6)	-0,86±0,2 (6)	-58±8 (6)	-2±3 (6)
R162K	-0,05±0,03 (5)	-0,71±0,24 (2)	-42±9 (5)	-1±2 (2)
E165A	-0,07±0,17 (4)		-55±9 (4)	
E165D	-0,2±0,1 (5)		-40±10 (5)	
E165Q	-0,05±0,05 (5)		-53±4 (5)	
E165T	-0,19±0,02 (2)		-46±2 (2)	
S169A	-0,66±0,16 (6)	-0,89±0,08 (7)	-30±12 (6)	-3,6±1,8 (7)
C170A	-0,03±0,06 (5)		-51±8 (5)	
K176A	-0,06±0,03 (6)		-48±9 (6)	
K176H	-0,02±0,02 (5)		-54±13 (5)	
K176R	-0,03±0,028 (8)	-0,85±0,29 (6)	-46±10 (8)	-4,3±3,8 (6)
C198A	-0,04±0,04 (6)		-41±12 (6)	
C198D	0,05±0,13 (7)		-58±13 (7)	

Tabelle A.4: Protonenselektivität von Chrimsonmutanten: Normalisierte Photoströme bei −60 mV und Umkehrpotentialverschiebungen beim Übergang von 110 mM Na⁺ pHe7,2 zu 110 mM Na⁺ pHe9,0 und 1 mM Na⁺ pHe7,2 mit intrazellulär 110 mM Na⁺ pHe7,2. Alle Messungen stellen Mittelwert und Standardabweichung dar mit der Anzahl der Messungen in Klammern.

	Norm. Photostrom (-60 mV)		ΔE_{rev}	
	110 mM NaCl pH _e 9,0	1 mM NaCl pH _e 7,2	110 mM NaCl pH _e 9,0	1 mM NaCl pH _e 7,2
WT	-0,028±0,012 (10)	-0,93±0,24 (8)	-50±7 (10)	-6±3 (8)
M201T	-0,048±0,018 (3)		-45±12 (3)	
M201Q	-0,021±0,007 (4)		-49±3 (4)	
M201N	-0,043±0,021 (4)		-47±5 (4)	
Y220F	-0,04±0,03 (4)		-39±12 (4)	
S223G	-0,03±0,024 (5)		-46±5 (5)	
M230T	-0,05±0,06 (3)		0±10 (3)	
Y231F	-0,03±0,02 (4)		-42±6 (4)	
Y268F	-0,03±0,042 (5)		-46±8 (5)	
W272F	-0,02±0,02 (4)		-45±8 (4)	
E277A	-0,06±0,03 (6)	-0,73±0,08 (4)	-45±3 (6)	-4,5±2,2 (4)
N287A	-0,083±0,013 (5)		-44±8 (5)	
N287E	0±0,3 (6)		-52±11 (6)	
C294A	-0,014±0,008 (3)		-49,2±1,5 (3)	
C294L	-0,04±0,016 (2)		-47±4 (2)	
D295A	-0,01±0,05 (4)		-46±13 (4)	
D295N	-0,14±0,08 (4)		-43±5 (4)	
D295E	-0,036±0,05 (5)		-46±9 (5)	
A298S	0,008±0,012 (5)		-56±3 (5)	
E300A	-0,05±0,04 (6)		-49±11 (6)	
E300N	-0,035±0,012 (6)		-53±3 (6)	
R310A	-0,077±0,013 (4)		0±5 (4)	

Tabelle A.4: Protonenselektivität von Chrimsonmutanten (Fortsetzung): Normalisierte Photoströme bei -60 mV und Umkehrpotentialverschiebungen beim Übergang von 110 mM Na⁺ pH_e7,2 zu 110 mM Na⁺ pH_e9,0 und 1 mM Na⁺ pH_e7,2 mit intrazellulär 110 mM Na⁺ pH_i7,2. Alle Messungen stellen Mittelwert und Standardabweichung dar mit der Anzahl der Messungen in Klammern.

	I_{peak} [pA/pF]	λ_{max} [nm]	$\tau_{\text{off,apparent}}$ [ms]		
			pH _e 7,2, -60 mV	pH _e 7,2, +30 mV	pH _e 9,0, +30 mV
WT	27±23 (17)	520,4±0,7 (7)	7±2 (17)	6±1 (15)	16±5 (6)
E119A	54±26 (6)		102±33 (6)	110±26 (6)	124±10 (4)
E120A	34±20 (9)		13±4 (9)	21±19 (9)	26±6 (3)
E127A	0,8±0,4 (7)	508±7 (5)	17±6 (4)	45±1 (2)	
H130A	19±12 (9)	500,8±0,7 (5)	69±7 (9)	89±7 (9)	270±69 (4)
G134E	5±2 (7)	523±5 (4)	3,5±0,2 (7)	3,1±0,6 (7)	21±7 (5)
E138A	3±2 (7)	521±5 (5)	9±3 (8)	9±2 (8)	9±1 (5)

Tabelle A.5: Photostromdichte, Aktivierungswellenlänge und Kinetiken von CsChR1 Mutanten: Photostromdichte bei maximaler Stromamplitude sowie Wellenlänge der maximalen Aktivierung bei 110 mM Na⁺, pH_ei7,2 und -60 mV. Außerdem apparente Schließkinetik des Photostroms bei -60 mV und 30 mV mit extrazellulär pH_e7,2 oder pH_e9,0. Alle Messungen stellen Mittelwert und Standardabweichung dar mit der Anzahl der unabhängigen Messungen in Klammern.

	$\tau_{on,1}$ [ms]	$\tau_{on,2}$ [ms]	$\tau_{off,1}$ [ms]	$\tau_{off,2}$ [ms]
dunkel-adaptiert				
-60 mV	0,17±0,03 (68±3)	2,6±0,7 (32±3)	10,3±0,5 (99±1)	150±220 (1±1)
-30 mV	0,12±0,02 (78±3)	2,3±0,8 (22±3)	13,2±1,2 (99±1)	70±30 (1±1)
30 mV	0,19±0,03 (74±4)	2,7±0,5 (26±4)	22±3 (97±1)	220±300 (3±1)
licht-adaptiert				
-60 mV	0,19±0,03 (71±3)	2,2±0,5 (29±3)	9±0,6 (97±1)	100±20 (3±1)
-30 mV	0,12±0,02 (75±5)	2,3±0,8 (29±3)	13,2±1,2 (88±24)	70±30 (12±24)
30 mV	0,19±0,03 (87±1)	2,7±0,5 (13±1)	22±3 (89±1)	220±300 (11±1)

Tabelle A.6: Photostromkinetiken von CrChR2 bei $pH_{i,e}7,2$: Photostromkinetiken nach 7 ns Laseranregung in 110 mM Na⁺ und $pH_{e,i}7,2$. Alle Messungen stellen Mittelwert und Standardabweichung dar mit $n > 5$ und dem Amplitudenanteil der entsprechenden Kinetik in Klammern (in %).

C1Chrimson - 5zih			C1C2			CrChR2 - 6eid		
Seitengruppe	Kette A	Kette B	Seitengruppe	3ug9	4yzi	Seitengruppe	Kette A	Kette B
E1' (E124)	6.1	6.6	E1' (E121)	6.1	5.9	E1' (E82)	4.6	4.4
E2' (E125)	2.0	0.9	E2' (E122)	8.3	5.9	E2' (E83)	6.5	6.4
E3' (E132)	11.9	10.8	E3' (E129)	9.2	9.6	E3' (E90)	8.3	8.3
E4' (E139)	5.9	6.3	E4' (E136)	7.8	7.1	E4' (E97)	4.2	4.2
E5' (E143)	9.5	9.5	E5' (E140)	6.0	8.6	E5' (E101)	9.5	9.0
Ci1 (E165)	8.8	10.3	Ci1 (E162)	5.8	2.8	Ci1 (E123)	5.7	5.6
C198	-	-	D195	8.0	7.5	D156	7.5	7.5
E277	4.9	5.6	E274	6.6	6.6	E235	5.9	6.1
Ci2 (D295)	3.9	3.5	Ci2 (D292)	3.2	5.4	Ci2 (D253)	1.1	1.2
E300	9.9	9.2	N297	-	-	N258	-	-

Tabelle A.7: pK_a -Werte ausgewählter Seitengruppen in C1Chrimson, C1C2 und CrChR2: pK_a -Werte wurden für die Kristallstrukturen von C1Chrimson (PDB: 5zih [Oda et al., 2018]), C1C2 WT (PDB: 3ug9 [Kato et al., 2012]), C1C2 GA (PDB: 4yzi [Kato et al., 2015b]) und CrChR2 (PDB: 6eid [Volkov et al., 2017]) mit PROPKA 3.1 unterstützt durch PDB2PQR 2.1 mit Hilfe der PlayMolecule ProteinPrepare Internetoberfläche berechnet [Martínez-Rosell et al., 2017].

A.3 Gerätelisten

Gerät	Hersteller	Beschreibung
Personal Cycler	Biometra	PCR-Maschine
PCR Sprint	Hybaid	PCR-Maschine
BioPhotometer Plus	Eppendorf	Photometer zur Konzentrationsbestimmung von DNA/RNA
Luna Automated Cell Counter	Logos Biosystems	Zellzähler verwendet in der Zellkultur von HEK293-Zellen
CP324S-OCE	Sartorius	Feinwaage
Thermomixer Comfort	Eppendorf	Temperaturverstellbarer Mixer
Labor-pH-Meter 765	Knick	pH-Meter
OM 815	Löser Messtechnik	Osmometer
Labor-Netzteil 7941	Zentro-Elektrik	Spannungsquelle zum Chlorieren der Silberelektroden
P-1000	Sutter	Micropipettenpuller verwendet für Patchpipetten
P-97	Sutter	Micropipettenpuller verwendet für TEVC-Pipetten
Nanoliter 2000	WPI	RNA-Mikroinjektor
DNA 120 SpeedVac	Thermo Scientific	Trocknen von RNA
Centrifuge 5415 R	Eppendorf	Tischkühlzentrifuge

Tabelle A.8: Für die Molekularbiologie und Vorbereitung elektrophysiologischer Experimente verwendete Geräte

Gerät	Hersteller	Beschreibung
Ecotron	Infors	Inkubationsschüttler für <i>e.coli</i>
BTX ECM630 + 630B	Artisan Technology	Elektroporationsystem für <i>Pichia pastoris</i>
Innova® 44	New Brunswick Scientific	Inkubationsschüttler für <i>Pichia pastoris</i>
HERAcell® 240	ThermoFisher	CO ₂ -Inkubator für HEK293-Zellen
CB 60	Binder	CO ₂ -Inkubator für HEK293-Zellen
CB 150	Binder	CO ₂ -Inkubator für HEK293-Zellen
MIR-153	Sanyo	Kühlbarer Inkubator für Oozyten
Megafuge® 1.0 R	ThermoFisher	Zentrifuge
Labofuge® 400 R	ThermoFisher	Zentrifuge
Avanti® J-20 XP	Beckman Coulter	Zentrifuge
JLA-8.1000	Beckman Coulter	Rotor
JL25.5	Beckman Coulter	Rotor
Ti45	Beckman Coulter	Rotor
Ti70	Beckman Coulter	Rotor
Ti70.1	Beckman Coulter	Rotor
HTU-Digi-F-Press	G.Heinemann Ultraschall und Labortechnik	Frenchpress für Zellaufschluss
Optima XE-90	Beckmann Coulter	Ultrazentrifuge
Äkta Xpress	GE Healthcare	Chromatographiesystem
Äkta Pure	GE Healthcare	Chromatographiesystem
HisTrap™	GE Healthcare	Ni-NTA Säule
HiPrep™26/10	GE Healthcare	Entsalzungssäule
Amicon® Ultra-15 Ultracel®-50K	Merck	Zentrifugen-Filtereinheiten

Tabelle A.9: Für die Proteinexpression und Aufreinigung verwendete Geräte und Materialien

Gerät	Hersteller	Beschreibung
DigiData 1400	Molecular Devices	Analog-Digital-Wandler
DigiData 1322	Molecular Devices	Analog-Digital-Wandler
DigiData 1440A	Molecular Devices	Analog-Digital-Wandler
Axopatch 200B	Molecular Devices	Patch-Clamp-Verstärker
GeneClamp 500	Molecular Devices	TEVC-Verstärker
Polychrom V	TILL Photonics	Wellenlängenverstellbare Lichtquelle
75W-Xenonlampe	Jena-Instruments	Weißlichtquelle
150W-Xenonlampe	LOT-QuantumDesign	Weißlichtquelle
Opolette HE 355 LD	OPOTEK	Nd:YAG-Laser/Opo-System
VS25	Vincent Associates	Shutter
LS6ZM2	Vincent Associates	Shutter
VS25	Vincent Associates	Shutter
T132	Vincent Associates	Schutter Driver
TTL-2	ASI	Schutter Driver
VCM-D1	Vincent Associates	Schutter Driver
K55	Optics Balzers	Breitbandfilter um 550 nm
NSR1	Newport	motorisierter Rotationshalter
50Q04AV.1	Newport	graduelles Neutraldichtefilterrad
M37L02	Thorlabs	Multimoden-Faser
AC127-019-A-ML	Thorlabs	achromatische Linse
BB1-E02	Thorlabs	dichroitischer Spiegel
MFF101/M	Thorlabs	motorisierter Filterwechsler
30%R/70%T	Chroma Technology	Strahlenteiler
90%R/10%T	Chroma Technology	Strahlenteiler
69008-ET-ECFP/EYFP/mCherry	Chroma Technology	Set aus Anregungs- und Emissionsfilter sowie dichroitischem Spiegel dichroitischer Spiegel
FF493/574	AHF-Analysetechnik	dichroitischer Tripleband-Spiegel
444/520/590	AHF-Analysetechnik	Tripleband-Emissionsfilter
465/537/623	AHF-Analysetechnik	Inverses Mikroskop
Axiovert 100	Carl Zeiss Jena	Wasser-Objektiv
W Plan-Apochromat 40x/1.0 DIC Objektiv	Carl Zeiss Jena	
Olympus iX70	Olympus	Mikroskop
Fluar 40x/1.30 Öl-Objektiv	Carl Zeiss Jena	Öl-Objektiv
Wild M32 Stereomikroskop	Wild Heerbrugg	Stereomikroskop für TEVC-Messungen
M-VW-3636-OPT-01	Newport	Antivibrationstisch
Wat-221S	Watec	CCD-Kamera
Imago CCD	TILL Photonics	CCD-Kamera für pH- und Ca ²⁺ -Imaging
AVT-BC2	AVT Horn	Kamera zum Visualisieren der Zellen
Ringer-Bath-Handler MPCU	Lorenz Messgerätebau	Sensor und Peristaltikpumpe
PumpPro	Watson-Marlow	manuell gesteuerte Peristaltikpumpe
PatchStar	Scientifica	Mikromanipulator
HCS-3202	Manson	Spannungsquelle für das Mikroskoplicht
S470C	Thorlabs	Thermischer-Lichtintensitätssensor
PM100D	Thorlabs	Spannungsmessgerät
P-9710	Gigahertz Optik	Optometer
ValveLink8.2-Pinch-Valve	AutoMate Scientific	Automatisches Perfusionssystem
Neutralfilter	Schott	Filterglas unterschiedlicher optischer Dichte
FluoView 1000	Olympus	konfokales Mikroskopsystem
LSM IX81	Olympus	konfokales Mikroskop
60x1.2 Wasser-Immersion- UplanSApo-Objektiv	Olympus	Objektiv des konfokalen Mikroskops
Cary 300 Bio	Agilent	Spektrophotometer

Tabelle A.10: Für die biophysikalische Messungen verwendete Geräte. Die für elektrophysiologische Messungen und bildgebenden Verfahren genutzten Komponenten können nach Tabelle 3.10 den einzelnen Messplätzen „HEK1“, „HEK2“ und „Oozyten“ zugeordnet werden können.

Programm	Hersteller	Beschreibung
Axon TM pClamp TM 9 - 11	Molecular Devices	Elektrophysiologie
Gentle	http://gentle.magnusmanske.de	Primerdesign
Matlab R2017a	MathWorks	Datenauswertung Elektrophysiologie
Origin 9.1	OriginLab	Datenauswertung und Abbildungen
Adobe Illustrator [®] CS6	Adobe	Abbildungen
Microsoft [®] Excel	Microsoft	Datenauswertung
Open-Source PyMOL TM 1.8.7	Schrödinger, LLC	Proteinstrukturdarstellung
CueMol2	http://www.cuemol.org/	Proteinstrukturdarstellung
Mendeley Desktop	Elsevier	Literaturverwaltung
TillvisION	TillPhotonics	Fluoreszenzbildgebung
FluoView FV10-ASW 3.0	Olympus	konfokale Mikroskopie
Fiji-Bildbearbeitungspaket	[Schindelin et al., 2012]	konfokale Mikroskopie

Tabelle A.11: Verwendete Computerprogramme

A.4 Chemikalien, Materialien und Zellen

Substanz	Hersteller	Beschreibung
Trypton/Pepton	Carl Roth	Bestandteil des LB-Mediums
Hefe-Extrakt	Carl Roth	Bestandteil des LB-Mediums
BactoAgar	Carl Roth	für Agar-Platten
LB-Medium (Lennox)	Carl Roth	LB-Medium
Ampicillin Natriumsalz	Carl Roth	Antibiotika
Kanamycinsulfat	Carl Roth	Antibiotika
Zeocin™	ThermoFisher	Antibiotika
PfuTurbo-DNA-Polymerase	Agilent	DNA-Polymerase für PCR
2 mM dNTP Mix	ThermoFisher	Nucleotide für PCR
FastDigest Restriktionsenzyme	ThermoFisher	Restriktionsenzyme für Klonierungen
T4-DNA-Ligase	ThermoFisher	Für DNA-Ligation
DpnI	Agilent	Restriktionsverdau
Nucleospin® Plasmid EasyPure Kit	Macherey-Nagel	Kit für DNA-Aufreinigung
NucleoBond® Xtra Midi Plus Kit	Macherey-Nagel	Kit für DNA-Aufreinigung
Nucleobond® Xtra Maxi Plus Kit	Macherey-Nagel	Kit für DNA-Aufreinigung
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit	Macherey-Nagel	Kit für Klonierung und Mutagenese
T7/SP6 mMessenger mMashine® Kit	Life Technologies	Kit für RNA-Transkription

Tabelle A.12: Für die Molekularbiologie verwendete Substanzen und Chemikalien

Substanz	Hersteller	Verwendungszweck
Hefe-Extrakt	BD Biosciences	Proteinexpression in <i>Pichia pastoris</i>
D-Sorbit	Carl Roth	Proteinexpression in <i>Pichia pastoris</i>
YNB	Invitrogen	Proteinexpression in <i>Pichia pastoris</i>
BME Vitamine Mix	Sigma-Aldrich	Proteinexpression in <i>Pichia pastoris</i>
all- <i>trans</i> -Retinal	Sigma-Aldrich	Proteinexpression
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich	Antibiotika
HEK293-Zellen	Sigma-Aldrich/DSMZ	Zellkultur
FKS	Biochrom	Nährmedium HEK-Zellen
Blasticidin	Invivogen	Antibiotikum stabile Zelllinie
DMEM	Biochrom	Nährmedium HEK-Zellen
DPBS	Biochrom	Zellenwaschen
FuGene® HD	Promega	Lipofektion
Tetracyclinhydrochlorid	ThermoFisher	Expressionsinduktion stabile Zelllinie
Imidazol	Carl Roth	Proteinaufreinigung
DDM	Glycon Biochemicals	Proteinaufreinigung
PMSF	Carl Roth	Protease Inhibitor für Proteinaufreinigung
DNAseI	Roche	Deoxyribonuklease für Proteinaufreinigung

Tabelle A.13: Für die Proteinexpression verwendete Substanzen und Chemikalien

Chemikalie, Zelllinie und Verbrauchsmaterialien	Hersteller	Verwendungszweck
<i>e.coli</i> XL1 blue	Stratagene	Gentechnische Arbeiten
<i>Xenopus laevis</i> Frösche	Nasco	Oozyten für TEVC-Messungen
HEK293-Zellen	Sigma-Aldrich/DSMZ	Patch-Clamp-Messungen
<i>Pichia pastoris</i> Stamm SMD 1168H		Proteinaufreinigung

Tabelle A.14: Verwendete Zellen, Stämme und Frösche Oozyten für TEVC-Messungen wurden *Xenopus laevis*-Froschweibchen operativ ein Tag vor der RNA-Injektion entnommen.

Substanzen	Hersteller	Beschreibung
FURA-2-AM	ThermoFisher	Ca ²⁺ -Indikator als Acetomethylester
BCECF	ThermoFisher	pH-Indikator
BCECF-AM	ThermoFisher	pH-Indikator als Acetomethylester
Sulfinpyrazon	Sigma-Aldrich	Aniontransportblocker gegen Extrusion von BCECF
Pluronic® F-127	Sigma-Aldrich	oberflächenaktive Substanz
Nigericin Natriumsalz	Sigma-Aldrich	H ⁺ /K ⁺ -Ionophor
Octadecyl-Rhodamin-B-Chloride (R-18)	ThermoFisher	fluoreszenter Membranmarker
10976-20ML	Fluka	UV-transparentes und nicht-fluoreszentes Immersionsöl

Tabelle A.15: Für bildgebende Verfahren genutzte Substanzen

Material	Hersteller	Verwendungszweck
Poly-D-Lysin	Merck	Beschichtung von Deckgläsern
Deckgläser (ø 15 mm)	Carl Roth	Patch-Clamp-Messungen
Silberdraht AG-T10 (ø 0,25 mm)	Science Products	Messelektroden
Silberdraht AG-T25 (ø 0,64 mm)	Science Products	Referenzelektroden
Borosilikatglas-Kapillaren 1,5 mm OD, 1,17 mm ID mit Filament	Harvard Apparatus	TEVC-Pipetten
G150F-3 Borosilikatgaskapillaren	Warner Instruments	Patchpipetten
Glass Replacement 3.5 Nanoltr	WPI	Kapillaren für Injektionspipette
Baysilone Silikonpaste	GE Bayer	Abdichten der Messkammer

Tabelle A.16: Verbrauchsmaterialien elektrophysiologischer Experimente

LITERATURVERZEICHNIS

- N. Agmon. The Grotthuss mechanism. *Chemical Physics Letters*, 244(5-6):456–462, oct 1995. ISSN 00092614. doi: 10.1016/0009-2614(95)00905-J. 1.5
- N. F. Al-Baldawi and R. F. Abercrombie. Cytoplasmic hydrogen ion diffusion coefficient. *Biophysical Journal*, 61(6):1470–9, 1992. ISSN 0006-3495. doi: 10.1016/S0006-3495(92)81953-7. 5.4.2
- P. Altoè, A. Cembran, M. Olivucci, and M. Garavelli. Aborted double bicycle-pedal isomerization with hydrogen bond breaking is the primary event of bacteriorhodopsin proton pumping. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(47):20172–7, nov 2010. ISSN 1091-6490. doi: 10.1073/pnas.1007000107. 1.2, 1.3.1
- L. H. Andersen, I. B. Nielsen, M. B. Kristensen, M. O. A. El Ghazaly, S. Haacke, M. B. Nielsen, and M. A. Petersen. Absorption of schiff-base retinal chromophores in vacuo. *Journal of the American Chemical Society*, 127(35):12347–50, sep 2005. ISSN 0002-7863. doi: 10.1021/ja051638j. 1.2
- E. Aneiros, L. Cao, M. Papakosta, E. B. Stevens, S. Phillips, and C. Grimm. The biophysical and molecular basis of TRPV1 proton gating. *The EMBO Journal*, 30(6):994–1002, mar 2011. ISSN 02614189. doi: 10.1038/emboj.2011.19. 5.8.4
- A. Ardevol and G. Hummer. Retinal isomerization and water-pore formation in channelrhodopsin-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(14):3557–3562, apr 2018. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.1700091115. 1.4.4, 5.2.3, 5.4.4, 5.4.5, 5.5, 5.6.1
- G. M. Avelar, R. I. Schumacher, P. A. Zaini, G. Leonard, T. A. Richards, and S. L. Gomes. A Rhodopsin-Guanylyl Cyclase Gene Fusion Functions in Visual Perception in a Fungus. *Current Biology*, 24(11):1234–1240, jun 2014. ISSN 09609822. doi: 10.1016/j.cub.2014.04.009. 1.1
- G. M. Avelar, T. Glaser, G. Leonard, T. A. Richards, H. Ulrich, and S. L. Gomes. A Cyclic GMP-Dependent K⁺ Channel in the Blastocladiomycete Fungus *Blastocladiella emersonii*. *Eukaryotic Cell*, 14(9):958–963, sep 2015. ISSN 1535-9778. doi: 10.1128/EC.00087-15. 1.1
- K. Babinski, S. Catarsi, G. Biagini, and P. Séguéla. Mammalian ASIC2a and ASIC3 Subunits Co-assemble into Heteromeric Proton-gated Channels Sensitive to Gd³⁺. *Journal of Biological Chemistry*, 275(37):28519–28525, sep 2000. ISSN 0021-9258. doi: 10.1074/jbc.M004114200. 5.8.4
- I. Baburin, S. Beyl, and S. Hering. Automated fast perfusion of *Xenopus* oocytes for drug screening. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 453(1):117–123, oct 2006. ISSN 0031-6768. doi: 10.1007/s00424-006-0125-y. 5.8.4
- J. Bachman. Site-Directed Mutagenesis. In J. Lorsch, editor, *Laboratory Methods in Enzymology: DNA*, volume 529 of *Methods in Enzymology*, pages 241–248. Academic Press, 2013. doi: 10.1016/B978-0-12-418687-3.00019-7. 3.1.3

- S. P. Balashov, R. Govindjee, M. Kono, E. Imasheva, E. Lukashev, T. G. Ebrey, R. K. Crouch, D. R. Menick, and Y. Feng. Effect of the arginine-82 to alanine mutation in bacteriorhodopsin on dark adaptation, proton release, and the photochemical cycle. *Biochemistry*, 32(39):10331–43, oct 1993. ISSN 0006-2960. doi: 10.1021/bi00090a008. 1.3.2, 5.3.3
- S. P. Balashov, E. S. Imasheva, R. Govindjee, and T. G. Ebrey. Titration of aspartate-85 in bacteriorhodopsin: what it says about chromophore isomerization and proton release. *Biophysical journal*, 70(1): 473–81, jan 1996. ISSN 0006-3495. doi: 10.1016/S0006-3495(96)79591-7. 5.3.3, 5.6.2
- S. P. Balashov, E. S. Imasheva, V. A. Boichenko, J. Antón, J. M. Wang, and J. K. Lanyi. Xanthorhodopsin: a proton pump with a light-harvesting carotenoid antenna. *Science*, 309(5743):2061–4, sep 2005. ISSN 1095-9203. doi: 10.1126/science.1118046. 1.3.3
- S. P. Balashov, L. E. Petrovskaya, E. P. Lukashev, E. S. Imasheva, A. K. Dioumaev, J. M. Wang, S. V. Sychev, D. A. Dolgikh, A. B. Rubin, M. P. Kirpichnikov, and J. K. Lanyi. Aspartate–Histidine Interaction in the Retinal Schiff Base Counterion of the Light-Driven Proton Pump of *Exiguobacterium sibiricum*. *Biochemistry*, 51(29):5748–5762, jul 2012. ISSN 0006-2960. doi: 10.1021/bi300409m. 1.3.3
- J. a. Ballesteros, X. Deupi, M. Olivella, E. E. Haaksma, and L. Pardo. Serine and threonine residues bend alpha-helices in the chi(1) = g(-) conformation. *Biophysical journal*, 79(5):2754–60, nov 2000. ISSN 0006-3495. doi: 10.1016/S0006-3495(00)76514-3. 5.1.4
- C. Bamann, T. Kirsch, G. Nagel, and E. Bamberg. Spectral Characteristics of the Photocycle of Channelrhodopsin-2 and Its Implication for Channel Function. *Journal of Molecular Biology*, 375(3): 686–694, 2008. ISSN 00222836. doi: 10.1016/j.jmb.2007.10.072. 1.4.2, 1.4.2, 5.2.2
- C. Bamann, R. Gueta, S. Kleinlogel, G. Nagel, and E. Bamberg. Structural Guidance of the Photocycle of Channelrhodopsin-2 by an Interhelical Hydrogen Bond. *Biochemistry*, 49(2):267–278, 2010. ISSN 0006-2960. doi: 10.1021/bi901634p. 1.4.1, 1.4.2, 1.4.5, 4.2.5, 4.5.3, 5.6
- C. Bamann, E. Bamberg, J. Wachtveitl, and C. Glaubitz. Proteorhodopsin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1837(5):614–625, may 2014. ISSN 00052728. doi: 10.1016/j.bbabi.2013.09.010. 1.3.3
- K. Barbara Schowen and R. L. Schowen. [29] Solvent isotope effects on enzyme systems. In Daniel L. Purich, editor, *Methods in Enzymology*, pages 551–606. Academic Press, 1982. ISBN 9780121819873. doi: 10.1016/S0076-6879(82)87031-6. 5.9
- S. Beck, J. Yu-Strzelczyk, D. Pauls, O. M. Constantin, C. E. Gee, N. Ehmman, R. J. Kittel, G. Nagel, and S. Gao. Synthetic Light-Activated Ion Channels for Optogenetic Activation and Inhibition. *Frontiers in Neuroscience*, 12, oct 2018. ISSN 1662-453X. doi: 10.3389/fnins.2018.00643. 5.8.4
- J. Becker-Baldus, C. Bamann, K. Saxena, H. Gustmann, L. J. Brown, R. C. D. Brown, C. Reiter, E. Bamberg, J. Wachtveitl, H. Schwalbe, and C. Glaubitz. Enlightening the photoactive site of channelrhodopsin-2 by DNP-enhanced solid-state NMR spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(32):9896–9901, aug 2015. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.1507713112. 1.4.2, 5.2.1, 5.3.4
- C. N. Bedbrook, A. J. Rice, K. K. Yang, X. Ding, S. Chen, E. M. LeProust, V. Gradinaru, and F. H. Arnold. Structure-guided SCHEMA recombination generates diverse chimeric channelrhodopsins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(13):E2624–E2633, 2017a. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.1700269114. 1.7

- C. N. Bedbrook, K. K. Yang, A. J. Rice, V. Gradinaru, and F. H. Arnold. Machine learning to design integral membrane channelrhodopsins for efficient eukaryotic expression and plasma membrane localization. *PLOS Computational Biology*, 13(10):e1005786, oct 2017b. ISSN 1553-7358. doi: 10.1371/journal.pcbi.1005786. 5.9
- C. N. Bedbrook, K. K. Yang, J. E. Robinson, V. Gradinaru, and F. H. Arnold. Machine learning-guided channelrhodopsin engineering enables minimally-invasive optogenetics. *bioRxiv*, 2019. doi: 10.1101/565606. 1.7
- O. Beja and J. K. Lanyi. Nature’s toolkit for microbial rhodopsin ion pumps. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(18):6538–6539, may 2014. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.1405093111. 1.3.3
- O. Béjà, L. Aravind, E. V. Koonin, M. T. Suzuki, A. Hadd, L. P. Nguyen, S. B. Jovanovich, C. M. Gates, R. A. Feldman, J. L. Spudich, E. N. Spudich, and E. F. DeLong. Bacterial rhodopsin: Evidence for a new type of phototrophy in the sea. *Science (New York, N.Y.)*, 289(5486):1902–6, sep 2000. ISSN 00368075. doi: 10.1126/science.289.5486.1902. 1.3.3
- O. Béjà, E. N. Spudich, J. L. Spudich, M. Leclerc, and E. F. DeLong. Proteorhodopsin phototrophy in the ocean. *Nature*, 411(6839):786–789, jun 2001. ISSN 0028-0836. doi: 10.1038/35081051. 1.1
- A. L. Bennett and I. S. Ramsey. CrossTalk opposing view: proton transfer in Hv1 utilizes a water wire, and does not require transient protonation of a conserved aspartate in the S1 transmembrane helix. *The Journal of Physiology*, 595(22):6797–6799, nov 2017. ISSN 00223751. doi: 10.1113/JP274553. 5.9
- K. Beppu, T. Sasaki, K. F. Tanaka, A. Yamanaka, Y. Fukazawa, R. Shigemoto, and K. Matsui. Optogenetic countering of glial acidosis suppresses glial glutamate release and ischemic brain damage. *Neuron*, 81(2):314–320, 2014. ISSN 08966273. doi: 10.1016/j.neuron.2013.11.011. 5.8.1
- T. K. Berger and E. Y. Isacoff. The pore of the voltage-gated proton channel. *Neuron*, 72(6):991–1000, 2011. ISSN 08966273. doi: 10.1016/j.neuron.2011.11.014. 5.4.3
- V. B. Bergo, O. A. Sineshchekov, J. M. Kralj, R. Partha, E. N. Spudich, K. J. Rothschild, and J. L. Spudich. His-75 in Proteorhodopsin, a Novel Component in Light-driven Proton Translocation by Primary Pumps. *Journal of Biological Chemistry*, 284(5):2836–2843, jan 2009. ISSN 0021-9258. doi: 10.1074/jbc.M803792200. 1.3.3, 5.1.1
- Y. A. Bernal Sierra, B. R. Rost, M. Pofahl, A. M. Fernandes, R. A. Kopton, S. Moser, D. Holtkamp, N. Masala, P. Beed, J. J. Tukker, S. Oldani, W. Bönigk, P. Kohl, H. Baier, F. Schneider-Warme, P. Hegemann, H. Beck, R. Seifert, and D. Schmitz. Potassium channel-based optogenetic silencing. *Nature communications*, 9(1):4611, 2018. ISSN 2041-1723. doi: 10.1038/s41467-018-07038-8. 5.8.4
- A. Berndt. *Mechanismus und anwendungsbezogene Optimierung von Channelrhodopsin-2*. PhD thesis, Humboldt-Universität zu Berlin, 2011. 3.10, 4.2.2, 4.5.3, 5.2.3
- A. Berndt and K. Deisseroth. Expanding the optogenetics toolkit. *Science*, 349(6248):590–591, aug 2015. ISSN 0036-8075. doi: 10.1126/science.aac7889. 1.4.6
- A. Berndt, O. Yizhar, L. A. Gunaydin, P. Hegemann, and K. Deisseroth. Bi-stable neural state switches. *Nature Neuroscience*, 12(2):229–234, 2009. ISSN 1097-6256. doi: 10.1038/nn.2247. 1.4.1, 1.6, 4.2.5, 4.5.3, 5.6

- A. Berndt, M. Prigge, D. Gradmann, and P. Hegemann. Two open states with progressive proton selectivities in the branched channelrhodopsin-2 photocycle. *Biophysical journal*, 98(5):753–61, 2010. ISSN 1542-0086. doi: 10.1016/j.bpj.2009.10.052. 1.4.5, 1.4.6, 2, 4.5, 5.2.2, 5.2.3, 5.4.1
- A. Berndt, P. Schoenenberger, J. Mattis, K. M. Tye, K. Deisseroth, P. Hegemann, and T. G. Oertner. High-efficiency channelrhodopsins for fast neuronal stimulation at low light levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(18):7595–7600, 2011. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.1017210108. 1.4.1, 5.3.2
- A. Berndt, S. Y. Lee, C. Ramakrishnan, and K. Deisseroth. Structure-guided transformation of channelrhodopsin into a light-activated chloride channel. *Science (New York, N.Y.)*, 344(6182):420–4, apr 2014. ISSN 1095-9203. doi: 10.1126/science.1252367. 1.4.6, 1.6, 4.2.5, 4.6.3, 5.4.4, 5.4.5
- A. Berndt, S. Y. Lee, J. Wietek, C. Ramakrishnan, E. E. Steinberg, A. J. Rashid, H. Kim, S. Park, A. Santoro, P. W. Frankland, S. M. Iyer, S. Pak, S. Ährlund-Richter, S. L. Delp, R. C. Malenka, S. A. Josselyn, M. Carlén, P. Hegemann, and K. Deisseroth. Structural foundations of optogenetics: Determinants of channelrhodopsin ion selectivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(4):822–9, jan 2016. ISSN 1091-6490. doi: 10.1073/pnas.1523341113. 1.6, 2, ??, 4.6.1, 5.4.4
- P. Berthold, S. P. Tsunoda, O. P. Ernst, W. Mages, D. Gradmann, and P. Hegemann. Channelrhodopsin-1 Initiates Phototaxis and Photophobic Responses in *Chlamydomonas* by Immediate Light-Induced Depolarization. *the Plant Cell Online*, 20(6):1665–1677, 2008. ISSN 1040-4651. doi: 10.1105/tpc.108.057919. 1.1, 1.4, 1.4.6, 5.3.1
- D. Bindreither and P. Lackner. Structural diversity of calcium binding sites. *General physiology and biophysics*, 28 Spec No:F82–8, 2009. ISSN 0231-5882. doi: 10.1111/ene.12978. 5.4.3
- P. E. Blatz, J. H. Mohler, and H. V. Navangul. Anion-induced wavelength regulation of absorption maxima of Schiff bases of retinal. *Biochemistry*, 11(5):848–855, feb 1972. ISSN 0006-2960. doi: 10.1021/bi00755a026. 1.2
- N. Bocquet, L. Prado De Carvalho, J. Cartaud, J. Neyton, C. Le Poupon, A. Taly, T. Grutter, J. P. Changeux, and P. J. Corringer. A prokaryotic proton-gated ion channel from the nicotinic acetylcholine receptor family. *Nature*, 445(7123):116–119, 2007. ISSN 14764687. doi: 10.1038/nature05371. 1.4.6, 4.6.3
- R. A. Bogomolni and J. L. Spudich. Identification of a third rhodopsin-like pigment in phototactic *Halo-bacterium halobium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(20):6250–6254, oct 1982. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.79.20.6250. 1.1
- R. A. Bogomolni, W. Stoeckenius, I. Szundi, E. Perozo, K. D. Olson, and J. L. Spudich. Removal of transducer HtrI allows electrogenic proton translocation by sensory rhodopsin I. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(21):10188–10192, 1994. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.91.21.10188. 1.1
- A.-N. Bondar, J. Baudry, S. Suhai, S. Fischer, and J. C. Smith. Key Role of Active-Site Water Molecules in Bacteriorhodopsin Proton-Transfer Reactions. *The Journal of Physical Chemistry B*, 112(47):14729–14741, nov 2008. ISSN 1520-6106. doi: 10.1021/jp801916f. 1.3.1
- O. Bousché, S. Sonar, M. P. Krebs, H. G. Khorana, and K. J. Rothschild. Time-resolved Fourier transform infrared spectroscopy of the bacteriorhodopsin mutant Tyr-185→Phe: Asp-96 reprotonates during O

- formation; Asp-85 and Asp-212 deprotonate during O decay. *Photochemistry and photobiology*, 56(6): 1085–95, dec 1992. ISSN 0031-8655. doi: 10.1111/j.1751-1097.1992.tb09732.x. 1.3.1
- E. S. Boyden, F. Zhang, E. Bamberg, G. Nagel, and K. Deisseroth. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nature neuroscience*, 8(9):1263–8, 2005. ISSN 1097-6256. doi: 10.1038/nn1525. 1.6
- F. J. Braun and P. Hegemann. Direct measurement of cytosolic calcium and pH in living *Chlamydomonas reinhardtii* cells. *European Journal of Cell Biology*, 78(3):199–208, 1999a. ISSN 01719335. doi: 10.1016/S0171-9335(99)80099-5. 9
- F.-J. Braun and P. Hegemann. Two Light-Activated Conductances in the Eye of the Green Alga *Volvox carteri*. *Biophysical Journal*, 76(3):1668–1678, mar 1999b. ISSN 00063495. doi: 10.1016/S0006-3495(99)77326-1. 1.1
- L. Brown and S. Chamorovsky. Light adaptation blockage in dehydrated purple membrane does not result from retinal isomerization inhibition. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 18(2-3): 123–126, may 1993. ISSN 10111344. doi: 10.1016/1011-1344(93)80053-C. 5.3.3
- L. S. Brown, Y. Yamazaki, A. Maeda, L. Sun, R. Needleman, and J. K. Lanyi. The proton transfers in the cytoplasmic domain of bacteriorhodopsin are facilitated by a cluster of interacting residues. *Journal of molecular biology*, 239(3):401–14, jun 1994. ISSN 0022-2836. doi: 10.1006/jmbi.1994.1381. 1.3.1
- C. Broyles, P. Robinson, and M. Daniels. Fluorescent, Bioluminescent, and Optogenetic Approaches to Study Excitable Physiology in the Single Cardiomyocyte. *Cells*, 7(6):51, may 2018. ISSN 2073-4409. doi: 10.3390/cells7060051. 1.6
- S. Bruun, H. Naumann, U. Kuhlmann, C. Schulz, K. Stehfest, P. Hegemann, and P. Hildebrandt. The chromophore structure of the long-lived intermediate of the C128T channelrhodopsin-2 variant. *FEBS letters*, 585(24):3998–4001, 2011. ISSN 1873-3468. doi: 10.1016/j.febslet.2011.11.007. 3.2.3, 3.5, 5.3.5
- S. Bruun, D. Stoeppler, A. Keidel, U. Kuhlmann, M. Luck, A. Diehl, M.-A. Geiger, D. Woodmansee, D. Trauner, P. Hegemann, H. Oschkinat, P. Hildebrandt, and K. Stehfest. Light–Dark Adaptation of Channelrhodopsin Involves Photoconversion between the all- trans and 13- cis Retinal Isomers. *Biochemistry*, 54(35):5389–5400, 2015. ISSN 0006-2960. doi: 10.1021/acs.biochem.5b00597. 1.4.2, 1.6, 1.4.5, 5.2.1, 5.2.2, 5.3.3
- K. Bryl, M. Taii, M. Yoshizawa, and T. Kobayashi. LIGHT ADAPTATION OF DARK-ADAPTED BACTERIORHODOPSIN STUDIED BY NANOSECOND TIME-RESOLVED ABSORPTION SPECTROSCOPY. *Photochemistry and Photobiology*, 56(6):1013–1018, dec 1992. ISSN 0031-8655. doi: 10.1111/j.1751-1097.1992.tb09724.x. 1.3.2, 5.2.2, 5.3.3
- P. A. Bullough and R. Henderson. The projection structure of the low temperature K intermediate of the bacteriorhodopsin photocycle determined by electron diffraction 1 Edited by T. Richmond. *Journal of Molecular Biology*, 286(5):1663–1671, mar 1999. ISSN 00222836. doi: 10.1006/jmbi.1999.2570. 1.3.1
- R. A. Busiello, S. Savarese, and A. Lombardi. Mitochondrial uncoupling proteins and energy metabolism. *Frontiers in Physiology*, 6:36, feb 2015. ISSN 1664-042X. doi: 10.3389/fphys.2015.00036. 5.8.1
- Y. Cao, L. Brown, J. Sasaki, A. Maeda, R. Needleman, and J. Lanyi. Relationship of proton release at the extracellular surface to deprotonation of the schiff base in the bacteriorhodopsin photocycle. *Biophysical Journal*, 68(4):1518–1530, apr 1995. ISSN 00063495. doi: 10.1016/S0006-3495(95)80324-3. 1.3

- A. Cembran, F. Bernardi, M. Olivucci, and M. Garavelli. Counterion controlled photoisomerization of retinal chromophore models: a computational investigation. *Journal of the American Chemical Society*, 126(49):16018–37, dec 2004. ISSN 0002-7863. doi: 10.1021/ja048782+. 5.3.3
- C.-H. Chang, S.-Y. Liu, R. Jonas, and R. Govindjee. The Pink Membrane: The Stable Photoproduct of Deionized Purple Membrane. *Biophysical Journal*, 52(4):617–623, oct 1987. ISSN 00063495. doi: 10.1016/S0006-3495(87)83252-6. 5.3.1
- S. Checover, E. Nachliel, N. A. Dencher, and M. Gutman. Mechanism of Proton Entry into the Cytoplasmic Section of the Proton-Conducting Channel of Bacteriorhodopsin †. *Biochemistry*, 36(45):13919–13928, nov 1997. ISSN 0006-2960. doi: 10.1021/bi9717542. 1.3.1
- X. Chen and S. Gründer. Permeating protons contribute to tachyphylaxis of the acid-sensing ion channel (ASIC) 1a. *The Journal of physiology*, 579(Pt 3):657–70, 2007. ISSN 0022-3751. doi: 10.1113/jphysiol.2006.120733. 1.4.6, 5.4.4
- C. Cheng, M. Kamiya, M. Takemoto, R. Ishitani, O. Nureki, N. Yoshida, and S. Hayashi. An Atomistic Model of a Precursor State of Light-Induced Channel Opening of Channelrhodopsin. *Biophysical Journal*, 115(7):1281–1291, 2018. ISSN 15420086. doi: 10.1016/j.bpj.2018.08.024. 5.5, 5.6.2
- J. Cheng, G. Nanayakkara, Y. Shao, R. Cueto, L. Wang, W. Y. Yang, Y. Tian, H. Wang, and X. Yang. Mitochondrial Proton Leak Plays a Critical Role in Pathogenesis of Cardiovascular Diseases. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*, pages 359–370. Springer, Cham, 2017. ISBN 978-3-319-55329-0. doi: 10.1007/978-3-319-55330-6_20. 5.8.1
- I. V. Chizhnikov, F. M. Geraghty, D. C. Ogden, A. Hayhurst, M. Antoniou, and A. J. Hay. Selective proton permeability and pH regulation of the influenza virus M2 channel expressed in mouse erythroleukaemia cells. *The Journal of Physiology*, 494(Pt 2):329–336, 1996. ISSN 0022-3751. doi: 10.1113/jphysiol.1996.sp021495. 1.4.6, 1.5
- Y. K. Cho, D. Park, A. Yang, F. Chen, A. S. Chuong, N. C. Klapoetke, and E. S. Boyden. Multidimensional screening yields channelrhodopsin variants having improved photocurrent and order-of-magnitude reductions in calcium and proton currents. *Journal of Biological Chemistry*, 294(11):3806–3821, mar 2019. ISSN 0021-9258. doi: 10.1074/jbc.RA118.006996. 5.9
- 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, and E. S. Boyden. High-performance genetically targetable optical neural silencing by light-driven proton pumps. *Nature*, 463(7277):98–102, 2010. ISSN 0028-0836. doi: 10.1038/nature08652. 1.2, 1.3.4, 1.6
- A. S. Chuong, M. L. Miri, V. Busskamp, G. A. C. Matthews, L. C. Acker, A. T. Sørensen, A. Young, N. C. Klapoetke, M. A. Henninger, S. B. Kodandaramaiah, M. Ogawa, S. B. Ramanlal, R. C. Bandler, B. D. Allen, C. R. Forest, B. Y. Chow, X. Han, Y. Lin, K. M. Tye, B. Roska, J. A. Cardin, and E. S. Boyden. Noninvasive optical inhibition with a red-shifted microbial rhodopsin. *Nature Neuroscience*, 17(8):1123–1129, aug 2014. ISSN 1097-6256. doi: 10.1038/nn.3752. 1.7
- L. B. Cohen, B. M. Salzberg, H. V. Davila, W. N. Ross, D. Landowne, a. S. Waggoner, and C. H. Wang. Changes in axon fluorescence during activity: Molecular probes of membrane potential. *Journal of Membrane Biology*, 19:1–36, 1974. doi: 10.1007/BF01869968. 9

- S. N. Cohen, A. C. Chang, and L. Hsu. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 69(8):2110–4, aug 1972. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.69.8.2110. 3.1.2
- S. N. Cohen, A. C. Chang, H. W. Boyer, and R. B. Helling. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70(11):3240–4, nov 1973. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.70.11.3240. 3.1.3
- C. A. Combs. Fluorescence Microscopy: A Concise Guide to Current Imaging Methods. In *Current Protocols in Neuroscience*, pages 1–19. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, jan 2010. ISBN 0471142301. doi: 10.1002/0471142301.ns0201s50. 3.4.3
- J. A. Connor and Z. Ahmed. Diffusion of ions and indicator dyes in neural cytoplasm. *Cell. Mol. Neurobiol.*, 4(1):53–66, 1984. ISSN 02724340. 5.4.2
- J. M. Cregg, K. J. Barringer, A. Y. Hessler, and K. R. Madden. *Pichia pastoris* as a host system for transformations. *Molecular and cellular biology*, 5(12):3376–85, dec 1985. ISSN 0270-7306. doi: 10.1128/mcb.5.12.3376. 3.2
- S. Cukierman. Proton mobilities in water and in different stereoisomers of covalently linked gramicidin A channels. *Biophysical journal*, 78(4):1825–34, 2000. ISSN 0006-3495. doi: 10.1016/S0006-3495(00)76732-4. 1.5, 5.4.3
- S. Cukierman. Et tu, Grotthuss! and other unfinished stories. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1757(8):876–885, 2006. ISSN 00052728. doi: 10.1016/j.bbabi.2005.12.001. 1.5
- Z. Dancsházy and Z. Tokaji. Blue light regeneration of bacteriorhodopsin bleached by continuous light. *FEBS Letters*, 476(3):171–173, jul 2000. ISSN 00145793. doi: 10.1016/S0014-5793(00)01714-2. 1.3.2
- A. Danon and W. Stoerkenius. Photophosphorylation in *Halobacterium halobium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 71(4):1234–1238, apr 1974. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.71.4.1234. 1.1
- N. Dascal. Voltage clamp recordings from *Xenopus* oocytes. *Current protocols in neuroscience*, Chapter 6: Unit 6.12, 2001. ISSN 1934-8576. doi: 10.1002/0471142301.ns0612s10. 3.3
- A. Dawydow, R. Gueta, D. Ljaschenko, S. Ullrich, M. Hermann, N. Ehmann, S. Gao, A. Fiala, T. Langenhan, G. Nagel, and R. J. Kittel. Channelrhodopsin-2-XXL, a powerful optogenetic tool for low-light applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(38):13972–7, 2014. ISSN 1091-6490. doi: 10.1073/pnas.1408269111. 4.2.5, 4.5.3, 4.25, 4.5.3, 5.3.4
- V. De-la Rosa, E. Suárez-Delgado, G. E. Rangel-Yescas, and L. D. Islas. Currents through Hv1 channels deplete protons in their vicinity. *The Journal of General Physiology*, 147(2):127–136, 2016. ISSN 0022-1295. doi: 10.1085/jgp.201511496. 1.5
- C. H. de Salomon and H. C. Spatz. Colour vision in *Drosophila melanogaster*: Wavelength discrimination. *Journal of comparative physiology*, 150(1):31–37, mar 1983. ISSN 0340-7594. doi: 10.1007/BF00605285. 1.7
- T. DeCoursey. Hydrogen ion currents in rat alveolar epithelial cells. *Biophysical Journal*, 60(5):1243–1253, nov 1991. ISSN 00063495. doi: 10.1016/S0006-3495(91)82158-0. 5.4.2

- T. E. Decoursey. Voltage-Gated Proton Channels and Other Proton Transfer Pathways. *Physiological Reviews*, 83(2):475–579, apr 2003. ISSN 0031-9333. doi: 10.1152/physrev.00028.2002. 1.5, 5.4.2, 5.4.4
- T. E. DeCoursey. Voltage-gated proton channels: molecular biology, physiology, and pathophysiology of the H(V) family. *Physiological reviews*, 93(2):599–652, 2013. ISSN 1522-1210. doi: 10.1152/physrev.00011.2012. 1.4.6
- T. E. DeCoursey. CrossTalk proposal: Proton permeation through H V 1 requires transient protonation of a conserved aspartate in the S1 transmembrane helix. *The Journal of Physiology*, 595(22):6793–6795, nov 2017. ISSN 00223751. doi: 10.1113/JP274495. 5.9
- T. E. DeCoursey. Voltage and pH sensing by the voltage-gated proton channel, H V 1. *Journal of The Royal Society Interface*, 15(141):20180108, apr 2018. ISSN 1742-5689. doi: 10.1098/rsif.2018.0108. 1.5
- T. E. DeCoursey and V. V. Cherny. Na(+)-H+ antiport detected through hydrogen ion currents in rat alveolar epithelial cells and human neutrophils. *J. Gen. Physiol.*, 103(May):755–785, 1994. 5.4.2
- T. E. DeCoursey and V. V. Cherny. Effects of buffer concentration on voltage-gated H+ currents: does diffusion limit the conductance? *Biophysical journal*, 71(1):182–93, 1996. ISSN 0006-3495. doi: 10.1016/S0006-3495(96)79215-9. 5.4.2
- T. E. DeCoursey and J. Hosler. Philosophy of voltage-gated proton channels. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*, 11(92):20130799, 2014. ISSN 1742-5662. doi: 10.1098/rsif.2013.0799. 1.5
- K. Deisseroth and P. Hegemann. The form and function of channelrhodopsin. *Science*, 357(6356):eaan5544, sep 2017. ISSN 0036-8075. doi: 10.1126/science.aan5544. 1.4.6
- K. Deisseroth, G. Feng, A. K. Majewska, G. Miesenböck, A. Ting, and M. J. Schnitzer. Next-generation optical technologies for illuminating genetically targeted brain circuits. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(41):10380–6, oct 2006. ISSN 1529-2401. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3863-06.2006. 1.6
- N. Demaurex, S. Grinstein, M. Jaconi, W. Schlegel, D. P. Lew, and K. H. Krause. Proton currents in human granulocytes: regulation by membrane potential and intracellular pH. *The Journal of Physiology*, 466(1):329–344, 1993. doi: 10.1113/JPHYSIOL.1993.SP019723. 1.4.6
- N. A. Dencher and M. P. Heyn. Bacteriorhodopsin monomers pump protons. *FEBS Letters*, 108(2):307–310, dec 1979. ISSN 00145793. doi: 10.1016/0014-5793(79)80552-9. 1.3
- N. A. Dencher, G. Papadopoulos, D. Dresselhaus, and G. Büldt. Light- and dark-adapted bacteriorhodopsin, a time-resolved neutron diffraction study. *Biochimica et biophysica acta*, 1026(1):51–6, jul 1990. ISSN 0006-3002. doi: 10.1016/0005-2736(90)90331-H. 1.3.2
- F. Di Virgilio, C. Fasolato, and T. H. Steinberg. Inhibitors of membrane transport system for organic anions block fura-2 excretion from PC12 and N2A cells. *The Biochemical journal*, 256(3):959–63, 1988. ISSN 0264-6021. doi: 10.1042/bj2560959. 9
- A. K. Dioumaev, H. T. Richter, L. S. Brown, M. Tanio, S. Tuzi, H. Saito, Y. Kimura, R. Needleman, and J. K. Lanyi. Existence of a proton transfer chain in bacteriorhodopsin: participation of Glu-194 in the release of protons to the extracellular surface. *Biochemistry*, 37(8):2496–506, feb 1998. ISSN 0006-2960. doi: 10.1021/bi971842m. 5.1.2

- A. K. Dioumaev, L. S. Brown, R. Needleman, and J. K. Lanyi. Fourier transform infrared spectra of a late intermediate of the bacteriorhodopsin photocycle suggest transient protonation of Asp-212. *Biochemistry*, 38(31):10070–8, aug 1999. ISSN 0006-2960. doi: 10.1021/bi990873+. 1.3.1, 5.3.2
- S. J. Doig, P. J. Reid, and R. A. Mathies. Picosecond time-resolved resonance Raman spectroscopy of bacteriorhodopsin's J, K, and KL intermediates. *Journal of Physical Chemistry*, 1991. ISSN 00223654. doi: 10.1021/j100169a054. 1.3.1
- I. Dokukina, A. Nenov, M. Garavelli, C. M. Marian, and O. Weingart. QM/MM Photodynamics of Retinal in the Channelrhodopsin Chimera C1C2 with OM3/MRCI. *ChemPhotoChem*, 3(2):107–116, feb 2019. ISSN 23670932. doi: 10.1002/cptc.201800185. 5.3.3, 9
- T. J. Dolinsky, J. E. Nielsen, J. A. McCammon, and N. A. Baker. PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. *Nucleic Acids Research*, 32(Web Server):W665–W667, jul 2004. ISSN 0305-1048. doi: 10.1093/nar/gkh381. 5.5
- L. Drachev, A. Kaulen, and V. Skulachev. Correlation of photochemical cycle, H⁺ release and uptake, and electric events in bacteriorhodopsin. *FEBS Letters*, 178(2):331–335, dec 1984. ISSN 00145793. doi: 10.1016/0014-5793(84)80628-6. 1.3.1
- L. Drachev, A. Kaulen, V. Skulachev, and V. Zorina. Electrogenic photocycle of the 13- cis retinal-containing bacteriorhodopsin with an M intermediate involved. *FEBS Letters*, 239(1):1–4, oct 1988. ISSN 00145793. doi: 10.1016/0014-5793(88)80533-7. 1.3.2
- L. Drachev, S. Dracheva, and A. Kaulen. pH dependence of the formation of an M-type intermediate in the photocycle of 13- cis -bacteriorhodopsin. *FEBS Letters*, 332(1-2):67–70, oct 1993. ISSN 00145793. doi: 10.1016/0014-5793(93)80486-E. 1.3.2, 5.4.5, 5.7
- L. A. Drachev, A. A. Jasaitis, A. D. Kaulen, A. A. Kondrashin, E. A. Liberman, I. B. Nemecek, S. A. Ostroumov, A. Y. Semenov, and V. P. Skulachev. Direct measurement of electric current generation by cytochrome oxidase, H⁺-ATPase and bacteriorhodopsin. *Nature*, 249(5455):321–324, may 1974. ISSN 0028-0836. doi: 10.1038/249321a0. 1.3.4
- L. A. Drachev, A. D. Kaulen, and V. P. Skulachev. Time resolution of the intermediate steps in the bacteriorhodopsin-linked electrogenesis. *FEBS Letters*, 87(1):161–167, mar 1978. ISSN 00145793. doi: 10.1016/0014-5793(78)80157-4. 1.3.4
- J. Du, L. R. Reznikov, M. P. Price, X.-m. Zha, Y. Lu, T. O. Moninger, J. a. Wemmie, and M. J. Welsh. Protons are a neurotransmitter that regulates synaptic plasticity in the lateral amygdala. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(24):8961–8966, jun 2014. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.1407018111. 5.8.4
- T. Dudev, B. Musset, D. Morgan, V. V. Cherny, S. M. E. Smith, K. Mazmanian, T. E. DeCoursey, and C. Lim. Selectivity Mechanism of the Voltage-gated Proton Channel, HV1. *Scientific reports*, 5(April):10320, 2015. ISSN 2045-2322. doi: 10.1038/srep10320. 1.5, 4.4, 5.4.4
- G. Duret, C. Van Renterghem, Y. Weng, M. Prevost, G. Moraga-Cid, C. Huon, J. M. Sonner, and P.-J. Corringer. Functional prokaryotic-eukaryotic chimera from the pentameric ligand-gated ion channel family. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(29):12143–12148, 2011. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.1104494108. ??, 4.6.3, 4.29

- T. G. Ebrey. pKa of the protonated Schiff base of visual pigments. *Methods in enzymology*, 315:196–207, 2000. ISSN 0076-6879. doi: 10.1016/S0076-6879(00)15844-6. 1.2
- K. Edman, P. Nollert, A. Royant, H. Belrhali, E. Pebay-Peyroula, J. Hajdu, R. Neutze, and E. M. Landau. High-resolution X-ray structure of an early intermediate in the bacteriorhodopsin photocycle. *Nature*, 401(6755):822–6, oct 1999. ISSN 0028-0836. doi: 10.1038/44623. 1.3.1
- S. Ehlenbeck, D. Gradmann, F.-J. Braun, and P. Hegemann. Evidence for a Light-Induced H⁺ Conductance in the Eye of the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biophysical Journal*, 82(2):740–751, feb 2002. ISSN 00063495. doi: 10.1016/S0006-3495(02)75436-2. 1.1, 11
- K. Eisenhauer, J. Kuhne, E. Ritter, A. Berndt, S. Wolf, E. Freier, F. Bartl, P. Hegemann, and K. Gerwert. In Channelrhodopsin-2 Glu-90 Is Crucial for Ion Selectivity and Is Deprotonated during the Photocycle. *Journal of Biological Chemistry*, 287(9):6904–6911, feb 2012. ISSN 0021-9258. doi: 10.1074/jbc.M111.327700. 1.4.3, 1.4.6, 4.2.8, 4.5.2, 5.4.4
- O. P. Ernst, P. a. Sánchez Murcia, P. Daldrop, S. P. Tsunoda, S. Kateriya, and P. Hegemann. Photoactivation of channelrhodopsin. *Journal of Biological Chemistry*, 283(3):1637–1643, 2008. ISSN 00219258. doi: 10.1074/jbc.M708039200. 1.4.2, 5.3.2, 5.3.3
- O. P. Ernst, D. T. Lodowski, M. Elstner, P. Hegemann, L. S. Brown, and H. Kandori. Microbial and Animal Rhodopsins: Structures, Functions, and Molecular Mechanisms. *Chemical Reviews*, 114(1):126–163, jan 2014. ISSN 0009-2665. doi: 10.1021/cr4003769. 1.1, 1.1, 1.2, 1.2, 1.3, 1.3.1, 4.2.5, 5.2.1
- P. Ernst, N. Xu, J. Song, J. Qu, H. Chen, M. S. Goldberg, J. Zhang, B. O. Rourke, X. Liu, and L. Zhou. Precisely control mitochondrial membrane potential with light to manipulate cell fate decisions. *bioRxiv*, 2018. doi: 10.1101/469668. 5.8.1
- K. Feldbauer, D. Zimmermann, V. Pintschovius, J. Spitz, C. Bamann, and E. Bamberg. Channelrhodopsin-2 is a leaky proton pump. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(30):12317–22, 2009. ISSN 1091-6490. doi: 10.1073/pnas.0905852106. 1.4.2, 1.4.6, 3.2.2, 4.6.3, 5.7.2
- E. A. Ferenczi, J. Vierock, K. Atsuta-Tsunoda, S. P. Tsunoda, C. Ramakrishnan, C. Gorini, K. Thompson, S. Y. Lee, A. Berndt, C. Perry, S. Minniberger, A. Vogt, J. Mattis, R. Prakash, S. Delp, K. Deisseroth, and P. Hegemann. Optogenetic approaches addressing extracellular modulation of neural excitability. *Scientific reports*, 6(23947):1–20, 2016. ISSN 2045-2322. doi: 10.1038/srep23947. ??, ??, ??, 5.7, 5.8.4, 19
- U. C. Fischer, P. Towner, and D. Oesterhelt. LIGHT INDUCED ISOMERISATION, AT ACIDIC pH, INITIATES HYDROLYSIS OF BACTERIORHODOPSIN TO BACTERIO-OPSIN AND 9-CIS-RETINAL. *Photochemistry and Photobiology*, 33(4):529–537, apr 1981. ISSN 0031-8655. doi: 10.1111/j.1751-1097.1981.tb05456.x. 1.3.2, 5.3.5
- S. P. A. Fodor, J. B. Ames, R. Gebhard, E. M. M. van den Berg, W. Stoeckenius, J. Lugtenburg, and R. A. Mathies. Chromophore structure in bacteriorhodopsin's N intermediate: implications for the proton-pumping mechanism. *Biochemistry*, 27(18):7097–101, 1988. ISSN 0006-2960. doi: 10.1021/bi00418a064. 1.3, 1.3.1
- K. W. Foster, J. Saranak, N. Patel, G. Zarilli, M. Okabe, T. Kline, and K. Nakanishi. A rhodopsin is the functional photoreceptor for phototaxis in the unicellular eukaryote *Chlamydomonas*. *Nature*, 311(5988):756–759, oct 1984. ISSN 0028-0836. doi: 10.1038/311756a0. 1.1

- E. Freier, S. Wolf, and K. Gerwert. Proton transfer via a transient linear water-molecule chain in a membrane protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(28): 11435–9, jul 2011. ISSN 1091-6490. doi: 10.1073/pnas.1104735108. 1.3.1, 5.6.1
- T. Friedrich, S. Geibel, R. Kalmbach, I. Chizhov, K. Ataka, J. Heberle, M. Engelhard, and E. Bamberg. Proteorhodopsin is a Light-driven Proton Pump with Variable Vectoriality. *Journal of Molecular Biology*, 321(5):821–838, aug 2002. ISSN 00222836. doi: 10.1016/S0022-2836(02)00696-4. 1.1, 1.3.3, 1.3.4, 5.7.1
- R. Fudim, M. Szczepek, J. Vierock, A. Vogt, A. Schmidt, G. Kleinau, P. Fischer, F. Bartl, P. Scheerer, and P. Hegemann. Design of a light-gated proton channel based on the crystal structure of *Coccomyxa* rhodopsin. *Science Signaling*, 12(573):eaav4203, mar 2019. ISSN 1945-0877. doi: 10.1126/scisignal.aav4203. 4.4, 4.21, 5.4.4, 5.6.1, 5.7, 5.7.1
- O. Gaiko and R. E. Dempski. Transmembrane domain three contributes to the ion conductance pathway of channelrhodopsin-2. *Biophysical Journal*, 104(6):1230–1237, 2013. ISSN 00063495. doi: 10.1016/j.bpj.2013.02.013. 1.4.6, 16, 4.2.9
- J. García-Martínez, M. Brunk, J. Avalos, and U. Terpitz. The CarO rhodopsin of the fungus *Fusarium fujikuroi* is a light-driven proton pump that retards spore germination. *Scientific Reports*, 5(1):7798, jul 2015. ISSN 2045-2322. doi: 10.1038/srep07798. 1.3.3
- C. Gasser, S. Taiber, C.-M. Yeh, C. H. Wittig, P. Hegemann, S. Ryu, F. Wunder, and A. Moglich. Engineering of a red-light-activated human cAMP/cGMP-specific phosphodiesterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(24):8803–8808, jun 2014. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.1321600111. 1.6
- S. Geibel, T. Friedrich, P. Ormos, P. G. Wood, G. Nagel, and E. Bamberg. The voltage-dependent proton pumping in bacteriorhodopsin is characterized by optoelectric behavior. *Biophysical journal*, 81(4): 2059–2068, 2001. ISSN 00063495. doi: 10.1016/S0006-3495(01)75855-9. 1.3.4, 4.2.1, 5.6.1, 5.7.1, 5.7.3
- S. Geibel, É. Lőrinczi, E. Bamberg, and T. Friedrich. Voltage dependence of proton pumping by bacteriorhodopsin mutants with altered lifetime of the M intermediate. *PloS one*, 8(9):e73338, 2013. ISSN 1932-6203. doi: 10.1371/journal.pone.0073338. 5.6.1
- C. Gergely, C. Ganea, and G. Váró. Combined optical and photoelectric study of the photocycle of 13-cis bacteriorhodopsin. *Biophysical Journal*, 67(2):855–861, aug 1994. ISSN 00063495. doi: 10.1016/S0006-3495(94)80545-4. 1.3.2, 5.3.3
- K. Gerwert, B. Hess, J. Soppa, and D. Oesterhelt. Role of aspartate-96 in proton translocation by bacteriorhodopsin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(13): 4943–7, jul 1989. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.86.13.4943. 1.3.1
- K. Gerwert, G. Souvignier, and B. Hess. Simultaneous monitoring of light-induced changes in protein side-group protonation, chromophore isomerization, and backbone motion of bacteriorhodopsin by time-resolved Fourier-transform infrared spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(24):9774–9778, dec 1990. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.87.24.9774. 1.3.1
- K. Gerwert, E. Freier, and S. Wolf. The role of protein-bound water molecules in microbial rhodopsins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1837(5):606–613, may 2014. ISSN 00052728. doi: 10.1016/j.bbabi.2013.09.006. 1.3

- N. B. Gillespie, K. J. Wise, L. Ren, J. A. Stuart, D. L. Marcy, J. Hillebrecht, Q. Li, L. Ramos, K. Jordan, S. Fyvie, and R. R. Birge. Characterization of the Branched-Photocycle Intermediates P and Q of Bacteriorhodopsin. *The Journal of Physical Chemistry B*, 106(51):13352–13361, dec 2002. ISSN 1520-6106. doi: 10.1021/jp021221p. 1.3.2
- A. L. Goldin. Expression of Ion Channels in *Xenopus* Oocytes. In *Expression and Analysis of Recombinant Ion Channels*, pages 1–25. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, FRG, jun 2006. ISBN 3527312099. doi: 10.1002/3527608095.ch1. 5.8.4
- E. G. Govorunova, O. A. Sineshchekov, H. Li, R. Janz, and J. L. Spudich. Characterization of a highly efficient blue-shifted channelrhodopsin from the marine alga *Platymonas subcordiformis*. *The Journal of biological chemistry*, 288(41):29911–22, oct 2013. ISSN 1083-351X. doi: 10.1074/jbc.M113.505495. 1.4.6, 10, ??, 4.1.1, 5.1.3, 5.4, 5.4.5
- E. G. Govorunova, O. A. Sineshchekov, R. Janz, X. Liu, and J. L. Spudich. Natural light-gated anion channels: A family of microbial rhodopsins for advanced optogenetics. *Science*, 349(6248):647–650, aug 2015. ISSN 0036-8075. doi: 10.1126/science.aaa7484. 1.1, 1.4, 10, 1.4.6, ??, ??, 4.6.1, 4.6.3, 5.1.4, 5.8.3
- E. G. Govorunova, O. A. Sineshchekov, and J. L. Spudich. *Proteomonas sulcata* ACR1: A Fast Anion Channelrhodopsin. *Photochemistry and Photobiology*, 92(2):257–263, 2016a. ISSN 17511097. doi: 10.1111/php.12558. 1.1, 1.4
- E. G. Govorunova, O. A. Sineshchekov, and J. L. Spudich. Structurally Distinct Cation Channelrhodopsins from Cryptophyte Algae. *Biophysical Journal*, 110(11):2302–2304, jun 2016b. ISSN 00063495. doi: 10.1016/j.bpj.2016.05.001. 1.1, 1.4, 1.4.6, 5.4.4
- E. G. Govorunova, O. A. Sineshchekov, H. Li, and J. L. Spudich. Microbial Rhodopsins: Diversity, Mechanisms, and Optogenetic Applications. *Annual Review of Biochemistry*, 86(1):845–872, jun 2017a. ISSN 0066-4154. doi: 10.1146/annurev-biochem-101910-144233. 1.1, 1.1, 1.4, 2, 5
- E. G. Govorunova, O. A. Sineshchekov, E. M. Rodarte, R. Janz, O. Morelle, M. Melkonian, G. K. Wong, and J. L. Spudich. The Expanding Family of Natural Anion Channelrhodopsins Reveals Large Variations in Kinetics, Conductance and Spectral Sensitivity. *Scientific Reports*, 7(1):43358, dec 2017b. ISSN 2045-2322. doi: 10.1038/srep43358. 1.1
- D. Gradmann, A. Berndt, F. Schneider, and P. Hegemann. Rectification of the channelrhodopsin early conductance. *Biophysical journal*, 101(5):1057–68, 2011. ISSN 1542-0086. doi: 10.1016/j.bpj.2011.07.040. 1.4.6, 4.2.3, 5.4.1, 5.4.3
- F. L. Graham, J. Smiley, W. C. Russell, and R. Nairn. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *The Journal of general virology*, 36(1):59–74, jul 1977. ISSN 0022-1317. doi: 10.1099/0022-1317-36-1-59. 3.2
- R. Green and E. J. Rogers. Transformation of Chemically Competent *E. coli*. In J. Lorsch, editor, *Laboratory Methods in Enzymology: DNA*, volume 529 of *Methods in Enzymology*, pages 329–336. Academic Press, 2013. doi: 10.1016/B978-0-12-418687-3.00028-8. 3.1.2
- D. A. Greenhalgh, D. L. Farrens, S. Subramaniam, and H. G. Khorana. Hydrophobic amino acids in the retinal-binding pocket of bacteriorhodopsin. *Journal of Biological Chemistry*, 268(27):20305–20311, 1993. ISSN 00219258. 4.2.5, 5.1.3, 5.3.4, 5.6.2

- C. Grimm, J. Vierock, P. Hegemann, and J. Wietek. Whole-cell Patch-clamp Recordings for Electrophysiological Determination of Ion Selectivity in Channelrhodopsins. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (123):1–8, may 2017. ISSN 1940-087X. doi: 10.3791/55497. 3.3.2, 3.10
- C. Grimm, A. Silapetere, A. Vogt, Y. A. Bernal Sierra, and P. Hegemann. Electrical properties, substrate specificity and optogenetic potential of the engineered light-driven sodium pump eKR2. *Scientific Reports*, 8(1):9316, dec 2018. ISSN 2045-2322. doi: 10.1038/s41598-018-27690-w. 5.4.2
- G. Grynkiewicz, M. Poenie, and R. Y. Tsien. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *Journal of Biological Chemistry*, 260(6):3440–3450, 1985. ISSN 00219258. doi: 3838314. 3.4.1
- M. D. Guiry and G. M. Guiry. AlgaeBase. World-wide electronic publication, 2017. 1.7
- L. A. Gunaydin, O. Yizhar, A. Berndt, V. S. Sohal, K. Deisseroth, and P. Hegemann. Ultrafast optogenetic control. *Nature Neuroscience*, 13(3):387–392, 2010. ISSN 1097-6256. doi: 10.1038/nn.2495. 1.4.3, 1.6, 4.2.6, 5.1.1, 3, 5.3.2
- Y. Guo, F. E. Beyle, B. M. Bold, A. Koslowski, W. Thiel, P. Hegemann, M. Marazzi, and M. Elstner. Active Site Structure and Absorption Spectrum of Channelrhodopsin-2 Wild-Type and C128T Mutant. *Chemical Science*, 7:3879–3891, 2016. ISSN 2041-6520. doi: 10.1039/C6SC00468G. 5.1.4
- J. B. Gurdon, C. D. Lane, H. R. Woodland, and G. Marbaix. Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature*, 233(5316):177–82, sep 1971. ISSN 0028-0836. doi: 10.1038/233177a0. 3.2
- I. Gushchin, P. Chervakov, P. Kuzmichev, A. N. Popov, E. Round, V. Borshchevskiy, A. Ishchenko, L. Petrovskaya, V. Chupin, D. A. Dolgikh, A. S. Arseniev, A. A. Arseniev, M. Kirpichnikov, and V. Gordeliy. Structural insights into the proton pumping by unusual proteorhodopsin from nonmarine bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(31):12631–6, jul 2013. ISSN 1091-6490. doi: 10.1073/pnas.1221629110. 1.3.3, 5.1.1, 5.6.1
- J. Halliwell, M. J. Whitaker, and D. Ogden. Using microelectrodes. In *Microelectrode Techniques, The Plymouth workshop handbook*, pages 1–15. Company of Biologists Cambridge, UK, 1994. 3.3.1
- O. P. Hamill, A. Marty, E. Neher, B. Sakmann, and F. J. Sigworth. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*, 391(2):85–100, aug 1981. ISSN 0031-6768. doi: 10.1007/BF00656997. 3.3
- P. Hamm, M. Zurek, T. Röschinger, H. Patzelt, D. Oesterheld, and W. Zinth. Femtosecond spectroscopy of the photoisomerisation of the protonated Schiff base of all-trans retinal. *Chemical Physics Letters*, 263(5):613–621, dec 1996. ISSN 0009-2614. doi: 10.1016/S0009-2614(96)01269-9. 1.2
- S. Hampel, C. E. McKellar, J. H. Simpson, and A. M. Seeds. Simultaneous activation of parallel sensory pathways promotes a grooming sequence in *Drosophila*. *eLife*, 6, sep 2017. ISSN 2050-084X. doi: 10.7554/eLife.28804. 5.8.1
- G. S. Harbison, S. O. Smith, J. A. Pardo, C. Winkel, J. Lugtenburg, J. Herzfeld, R. Mathies, and R. G. Griffin. Dark-adapted bacteriorhodopsin contains 13-cis, 15-syn and all-trans, 15-anti retinal Schiff bases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(6):1706–1709, mar 1984. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.81.6.1706. 1.3.2, 5.3.3

- G. S. Harbison, S. O. Smith, J. A. Pardo, J. M. L. Courtin, J. Lugtenburg, J. Herzfeld, R. A. Mathies, and R. G. Griffin. Solid-state carbon-13 NMR detection of a perturbed 6-s-trans chromophore in bacteriorhodopsin. *Biochemistry*, 24(24):6955–6962, nov 1985. ISSN 0006-2960. doi: 10.1021/bi00345a031. 1.2
- A. Harris, M. Ljumovic, A.-N. Bondar, Y. Shibata, S. Ito, K. Inoue, H. Kandori, and L. S. Brown. A new group of eubacterial light-driven retinal-binding proton pumps with an unusual cytoplasmic proton donor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1847(12):1518–1529, dec 2015. ISSN 00052728. doi: 10.1016/j.bbabi.2015.08.003. 1.3.3
- T. K. Harris and G. J. Turner. Structural basis of perturbed pKa values of catalytic groups in enzyme active sites. *IUBMB life*, 53(2):85–98, feb 2002. ISSN 1521-6543. doi: 10.1080/15216540211468. 5.1.1
- H. Harz and P. Hegemann. Rhodopsin-regulated calcium currents in *Chlamydomonas*. *Nature*, 351(6326):489–491, jun 1991. ISSN 0028-0836. doi: 10.1038/351489a0. 1.1, 1.4.6
- H. Harz, C. Nonnengasser, and P. Hegemann. The photoreceptor current of the green alga *Chlamydomonas*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 338(1283):39–52, oct 1992. ISSN 0962-8436. doi: 10.1098/rstb.1992.0127. 1.4, 1.4.6
- A. Hassanali, F. Giberti, J. Cuny, T. D. Kühne, and M. Parrinello. Proton transfer through the water gossamer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(34):13723–8, aug 2013. ISSN 1091-6490. doi: 10.1073/pnas.1306642110. 1.5
- U. Haupts, J. Tittor, E. Bamberg, and D. Oesterhelt. General Concept for Ion Translocation by Halobacterial Retinal Proteins: The Isomerization/Switch/Transfer (IST) Model. *Biochemistry*, 36(1):2–7, jan 1997. ISSN 0006-2960. doi: 10.1021/bi962014g. 1.3.4
- S. Hayashi, E. Tajkhorshid, and K. Schulten. Structural Changes during the Formation of Early Intermediates in the Bacteriorhodopsin Photocycle. *Biophysical Journal*, 83(3):1281–1297, sep 2002. ISSN 00063495. doi: 10.1016/S0006-3495(02)73900-3. 1.3.1
- J. Heberle. Proton transfer reactions across bacteriorhodopsin and along the membrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1458(1):135–147, may 2000. ISSN 00052728. doi: 10.1016/S0005-2728(00)00064-5. 1.3
- J. Heberle and N. A. Dencher. Surface-bound optical probes monitor protein translocation and surface potential changes during the bacteriorhodopsin photocycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(13):5996–6000, jul 1992. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.89.13.5996. 1.3, 1.3.1
- J. Heberle, J. Riesle, G. Thiedemann, D. Oesterhelt, and N. A. Dencher. Proton migration along the membrane surface and retarded surface to bulk transfer. *Nature*, 370(6488):379–382, aug 1994. ISSN 0028-0836. doi: 10.1038/370379a0. 5.8.4
- J. Heberle, J. Fitter, H. J. Sass, and G. Büldt. Bacteriorhodopsin: the functional details of a molecular machine are being resolved. *Biophysical Chemistry*, 85(2-3):229–248, jul 2000. ISSN 03014622. doi: 10.1016/S0301-4622(99)00154-4. 1.3, 1.3, 1.3.1
- P. Hegemann. Algal sensory photoreceptors. *Annu. Rev. Plant. Biol.*, 59:167–189, 2008. ISSN 1543-5008. doi: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092847. 1.4.6

- P. Hegemann, S. Ehlenbeck, and D. Gradmann. Multiple photocycles of channelrhodopsin. *Biophysical journal*, 89(6):3911–8, 2005. ISSN 0006-3495. doi: 10.1529/biophysj.105.069716. 1.6, 1.4.5, 5.2.2, 5.3.3
- N. Hellwig, T. D. Plant, W. Janson, M. Schäfer, G. Schultz, and M. Schaefer. TRPV1 acts as proton channel to induce acidification in nociceptive neurons. *Journal of Biological Chemistry*, 279(33):34553–34561, 2004. ISSN 00219258. doi: 10.1074/jbc.M402966200. 1.4.6
- F. Hempelmann, S. Hölper, M.-K. Verhoefen, A. C. Woerner, T. Köhler, S.-A. Fiedler, N. Pflieger, J. Wachtveitl, and C. Glaubitz. His75-Asp97 cluster in green proteorhodopsin. *Journal of the American Chemical Society*, 133(12):4645–54, mar 2011. ISSN 1520-5126. doi: 10.1021/ja111116a. 1.3.3, 5.1.1
- R. Henderson and P. N. T. Unwin. Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy. *Nature*, 257(5521):28–32, sep 1975. ISSN 0028-0836. doi: 10.1038/257028a0. 1.3
- J. Herbst, K. Heyne, and R. Diller. Femtosecond infrared spectroscopy of bacteriorhodopsin chromophore isomerization. *Science (New York, N.Y.)*, 297(5582):822–5, aug 2002. ISSN 1095-9203. doi: 10.1126/science.1072144. 1.3.1
- P. Hildebrandt and M. Stockburger. Role of water in bacteriorhodopsin's chromophore: resonance Raman study. *Biochemistry*, 23(23):5539–5548, nov 1984. ISSN 0006-2960. doi: 10.1021/bi00318a025. 5.3.3
- B. Hille. *Ion Channels of Excitable Membranes*. Sunderland, Mass: Sinauer Associates, Inc., 3rd edition, 2001. ISBN 0878933212. 3.6.1, 3.6.1, 11
- S. B. Hladky and D. A. Haydon. Ion transfer across lipid membranes in the presence of gramicidin A. I. Studies of the unit conductance channel. *BBA - Biomembranes*, 274(2):294–312, 1972. ISSN 00052736. doi: 10.1016/0005-2736(72)90178-2. 1.5
- B. K. Ho and F. Gruswitz. HOLLOW: generating accurate representations of channel and interior surfaces in molecular structures. *BMC structural biology*, 8:49, nov 2008. ISSN 1472-6807. doi: 10.1186/1472-6807-8-49. 1.4
- A. L. Hodgkin. the Ionic Basis of Electrical Activity in Nerve and Muscle. *Biological Reviews*, 26(4): 339–409, 1951. ISSN 1464-7931. doi: 10.1111/j.1469-185X.1951.tb01204.x. 4.6.1
- W. D. Hoff, K.-H. Jung, and J. L. Spudich. Molecular mechanism of Photosignaling by archaeal Sensory Rhodopsins. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 26(1):223–258, jun 1997. ISSN 1056-8700. doi: 10.1146/annurev.biophys.26.1.223. 1.1
- J. Hoffmann, L. Aslimovska, C. Bamann, C. Glaubitz, E. Bamberg, and B. Brutschy. Studying the stoichiometries of membrane proteins by mass spectrometry: microbial rhodopsins and a potassium ion channel. *Physical chemistry chemical physics : PCCP*, 12(14):3480–5, apr 2010. ISSN 1463-9084. doi: 10.1039/b924630d. 1.4.1
- M. Hoffmann, M. Wanko, P. Strodel, P. H. König, T. Frauenheim, K. Schulten, W. Thiel, E. Tajkhorshid, and M. Elstner. Color tuning in rhodopsins: The mechanism for the spectral shift between bacteriorhodopsin and sensory rhodopsin II. *Journal of the American Chemical Society*, 128(33):10808–10818, 2006. ISSN 00027863. doi: 10.1021/ja062082i. 5.1.2

- J. Hofrichter, E. Henry, and R. Lozier. Photocycles of bacteriorhodopsin in light- and dark-adapted purple membrane studied by time-resolved absorption spectroscopy. *Biophysical Journal*, 56(4):693–706, oct 1989. ISSN 00063495. doi: 10.1016/S0006-3495(89)82716-X. 1.3.2, 5.3.3
- M. Holz, L. A. Drachev, T. Mogi, H. Otto, A. D. Kaulen, M. P. Heyn, V. P. Skulachev, and H. G. Khorana. Replacement of aspartic acid-96 by asparagine in bacteriorhodopsin slows both the decay of the M intermediate and the associated proton movement. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(7):2167–71, apr 1989. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.86.23.9228. 1.3.1
- Y. Hontani, M. Marazzi, K. Stehfest, T. Mathes, I. H. M. van Stokkum, M. Elstner, P. Hegemann, and J. T. M. Kennis. Reaction dynamics of the chimeric channelrhodopsin C1C2. *Scientific Reports*, 7(1): 7217, 2017. ISSN 2045-2322. doi: 10.1038/s41598-017-07363-w. 1.4.2, 7, ??
- S. Hososhima, S. Sakai, T. Ishizuka, and H. Yawo. Kinetic Evaluation of Photosensitivity in Bi-Stable Variants of Chimeric Channelrhodopsins. *Plos One*, 10(3):e0119558, 2015. ISSN 1932-6203. doi: 10.1371/journal.pone.0119558. 4.2.5
- S.-Y. Hou, E. G. Govorunova, M. Ntefidou, C. E. Lane, E. N. Spudich, O. A. Sineshchekov, and J. L. Spudich. Diversity of Chlamydomonas channelrhodopsins. *Photochemistry and photobiology*, 88(1): 119–28, 2012. ISSN 1751-1097. doi: 10.1111/j.1751-1097.2011.01027.x. 1.1, 1.4, 5.4.2
- H. Houjou, Y. Inoue, and M. Sakurai. Study of the Opsin Shift of Bacteriorhodopsin: Insight from QM/MM Calculations with Electronic Polarization Effects of the Protein Environment. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2001. ISSN 1520-6106. doi: 10.1021/jp0032863. 1.2
- K. Inoue, H. Ono, R. Abe-Yoshizumi, S. Yoshizawa, H. Ito, K. Kogure, and H. Kandori. A light-driven sodium ion pump in marine bacteria. *Nature Communications*, 4(1):1678, dec 2013. ISSN 2041-1723. doi: 10.1038/ncomms2689. 1.1, 5.1.4
- K. Inoue, T. Tsukamoto, K. Shimono, Y. Suzuki, S. Miyauchi, S. Hayashi, H. Kandori, and Y. Sudo. Converting a Light-Driven Proton Pump into a Light-Gated Proton Channel. *Journal of the American Chemical Society*, 137(9):3291–3299, mar 2015. ISSN 0002-7863. doi: 10.1021/ja511788f. 1.3.4
- K. Inoue, S. Ito, Y. Kato, Y. Nomura, M. Shibata, T. Uchihashi, S. P. Tsunoda, and H. Kandori. A natural light-driven inward proton pump. *Nature Communications*, 7(May):1–10, 2016. ISSN 20411723. doi: 10.1038/ncomms13415. 1.1, 1.3.3, 4.2.12, 5.7.3
- K. Inoue, S. Tahara, Y. Kato, S. Takeuchi, T. Tahara, and H. Kandori. Spectroscopic Study of Proton-Transfer Mechanism of Inward Proton-Pump Rhodopsin, Parvularcula oceani Xenorhodopsin. *Journal of Physical Chemistry B*, 122(25):6453–6461, 2018. ISSN 15205207. doi: 10.1021/acs.jpcc.8b01279. 1.3.3, 4.2.12
- H. Irieda, T. Morita, K. Maki, M. Homma, H. Aiba, and Y. Sudo. Photo-induced regulation of the chromatic adaptive gene expression by Anabaena sensory rhodopsin. *The Journal of biological chemistry*, 287(39): 32485–93, sep 2012. ISSN 1083-351X. doi: 10.1074/jbc.M112.390864. 1.1
- T. Ishizuka, M. Kakuda, R. Araki, and H. Yawo. Kinetic evaluation of photosensitivity in genetically engineered neurons expressing green algae light-gated channels. *Neuroscience research*, 54(2):85–94, feb 2006. ISSN 0168-0102. doi: 10.1016/j.neures.2005.10.009. 1.6

- C. Janke, F. Scholz, J. Becker-Baldus, C. Glaubitz, P. G. Wood, E. Bamberg, J. Wachtveitl, and C. Bammann. Photocycle and Vectorial Proton Transfer in a Rhodopsin from the Eukaryote *Oxyrrhis marina*. *Biochemistry*, 52(16):2750–2763, apr 2013. ISSN 0006-2960. doi: 10.1021/bi301412n. 1.3.3
- M. L. Jensen, A. Schousboe, and P. K. Ahring. Charge selectivity of the Cys-loop family of ligand-gated ion channels. *Journal of Neurochemistry*, 92(2):217–225, jan 2005. ISSN 0022-3042. doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02883.x. 1.4.6
- N. H. Joh, A. Min, S. Faham, J. P. Whitelegge, D. Yang, V. L. Woods, and J. U. Bowie. Modest stabilization by most hydrogen-bonded side-chain interactions in membrane proteins. *Nature*, 453(7199):1266–70, jun 2008. ISSN 1476-4687. doi: 10.1038/nature06977. 5.6.2
- M. T. J. Johnson, E. J. Carpenter, Z. Tian, R. Bruskiwich, J. N. Burris, C. T. Carrigan, M. W. Chase, N. D. Clarke, S. Covshoff, C. W. DePamphilis, P. P. Edger, F. Goh, S. Graham, S. Greiner, J. M. Hibberd, I. Jordon-Thaden, T. M. Kutchan, J. Leebens-Mack, M. Melkonian, N. Miles, H. Myburg, J. Patterson, J. C. Pires, P. Ralph, M. Rolf, R. F. Sage, D. Soltis, P. Soltis, D. Stevenson, C. N. Stewart, B. Surek, C. J. M. Thomsen, J. C. Villarreal, X. Wu, Y. Zhang, M. K. Deyholos, and G. K.-S. Wong. Evaluating Methods for Isolating Total RNA and Predicting the Success of Sequencing Phylogenetically Diverse Plant Transcriptomes. *PLoS ONE*, 7(11):e50226, nov 2012. ISSN 1932-6203. doi: 10.1371/journal.pone.0050226. 1.7
- N. Y. Jun and J. A. Cardin. Channelrhodopsin variants engage distinct patterns of network activity. *bioRxiv*, 2018. doi: 10.1101/275644. 5.8.1
- K. H. Jung, V. D. Trivedi, and J. L. Spudich. Demonstration of a sensory rhodopsin in eubacteria. *Molecular Microbiology*, 47(6):1513–1522, 2003. ISSN 0950382X. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03395.x. 1.1
- J. Kalia and K. J. Swartz. Elucidating the molecular basis of action of a classic drug: guanidine compounds as inhibitors of voltage-gated potassium channels. *Molecular pharmacology*, 80(6):1085–95, dec 2011. ISSN 1521-0111. doi: 10.1124/mol.111.074989. 5.4.3
- M. Kamiya, H. E. Kato, R. Ishitani, O. Nureki, and S. Hayashi. Structural and spectral characterizations of C1C2 channelrhodopsin and its mutants by molecular simulations. *Chemical Physics Letters*, 556: 266–271, jan 2013. ISSN 00092614. doi: 10.1016/j.cplett.2012.11.066. 1.4.1
- H. Kandori. Ion-pumping microbial rhodopsins. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2(September), 2015. ISSN 2296-889X. doi: 10.3389/fmolb.2015.00052. 1.3
- A. Kapus, R. Romanek, A. Y. Qu, O. D. Rotstein, and S. Grinstein. A pH-sensitive and voltage-dependent proton conductance in the plasma membrane of macrophages. *The Journal of general physiology*, 102(4):729–60, 1993. ISSN 0022-1295. doi: 10.1085/jgp.102.4.729. 1.4.6
- M. Karasuyama, K. Inoue, R. Nakamura, H. Kandori, and I. Takeuchi. Understanding Colour Tuning Rules and Predicting Absorption Wavelengths of Microbial Rhodopsins by Data-Driven Machine-Learning Approach. *Scientific reports*, 8(1):15580, oct 2018. ISSN 2045-2322. doi: 10.1038/s41598-018-33984-w. 5.1.4
- H. E. Kato, F. Zhang, O. Yizhar, C. Ramakrishnan, T. Nishizawa, K. Hirata, J. Ito, Y. Aita, T. Tsukazaki, S. Hayashi, P. Hegemann, A. D. Maturana, R. Ishitani, K. Deisseroth, and O. Nureki. Crystal structure of the channelrhodopsin light-gated cation channel. *Nature*, 482(7385):369–374, 2012. ISSN 0028-0836. doi: 10.1038/nature10870. 1.4.1, 1.4, 5.1, 5.1.1, 5.1.4, 5.4.1, 5.5, 5.6, 5.6.1, 5.6.2, A.7

- H. E. Kato, K. Inoue, R. Abe-Yoshizumi, Y. Kato, H. Ono, M. Konno, S. Hososhima, T. Ishizuka, M. R. Hoque, H. Kunitomo, J. Ito, S. Yoshizawa, K. Yamashita, M. Takemoto, T. Nishizawa, R. Taniguchi, K. Kogure, A. D. Maturana, Y. Iino, H. Yawo, R. Ishitani, H. Kandori, and O. Nureki. Structural basis for Na(+) transport mechanism by a light-driven Na(+) pump. *Nature*, 521(7550):48–53, may 2015a. ISSN 1476-4687. doi: 10.1038/nature14322. 5.1.4, 5.4.5
- H. E. Kato, M. Kamiya, S. Sugo, J. Ito, R. Taniguchi, A. Orito, K. Hirata, A. Inutsuka, A. Yamanaka, A. D. Maturana, R. Ishitani, Y. Sudo, S. Hayashi, and O. Nureki. Atomistic design of microbial opsin-based blue-shifted optogenetics tools. *Nature communications*, 6(May):7177, 2015b. ISSN 2041-1723. doi: 10.1038/ncomms8177. 1.4.1, 5.1, 5.1, 5.1.3, 5.5, 5.6, 5.6.1, A.7
- H. E. Kato, Y. S. Kim, J. M. Paggi, K. E. Evans, W. E. Allen, C. Richardson, K. Inoue, S. Ito, C. Ramakrishnan, L. E. Fenno, K. Yamashita, D. Hilger, S. Y. Lee, A. Berndt, K. Shen, H. Kandori, R. O. Dror, B. K. Kobilka, and K. Deisseroth. Structural mechanisms of selectivity and gating in anion channelrhodopsins. *Nature*, 561(7723):349–354, sep 2018. ISSN 1476-4687. doi: 10.1038/s41586-018-0504-5. 1.4.1, 1.4.6, 2, 5.4.5, 5.5, 13
- J. C. Kaufmann, B. S. Krause, C. Grimm, E. Ritter, P. Hegemann, and F. J. Bartl. Proton transfer reactions in the red light-activatable channelrhodopsin variant ReaChR and their relevance for its function. *Journal of Biological Chemistry*, 292(34):14205–14216, 2017. ISSN 1083351X. doi: 10.1074/jbc.M117.779629. 1.4.3, 5.1.1, 5.3.2, 5.3.3, 5.3.4, 5.6.2
- A. Kawanabe, Y. Furutani, K.-H. Jung, and H. Kandori. FTIR Study of the Photoisomerization Processes in the 13- cis and All- trans Forms of Anabaena Sensory Rhodopsin at 77 K †. *Biochemistry*, 45(14):4362–4370, apr 2006. ISSN 0006-2960. doi: 10.1021/bi052324b. 5.3.4
- A. Kawanabe, Y. Furutani, K.-H. Jung, and H. Kandori. Photochromism of Anabaena sensory rhodopsin. *Journal of the American Chemical Society*, 129(27):8644–9, jul 2007. ISSN 0002-7863. doi: 10.1021/ja072085a. 5.3.3, 5.7.3
- D. A. Kelkar and A. Chattopadhyay. The gramicidin ion channel: A model membrane protein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1768(9):2011–2025, sep 2007. ISSN 00052736. doi: 10.1016/j.bbamem.2007.05.011. 1.5
- M. J. Kennedy, R. M. Hughes, L. A. Peteya, J. W. Schwartz, M. D. Ehlers, and C. L. Tucker. Rapid blue-light-mediated induction of protein interactions in living cells. *Nature Methods*, 7(12):973–975, 2010. ISSN 1548-7091. doi: 10.1038/nmeth.1524. 1.6
- L. Keszthelyi and P. Ormos. Electric signals associated with the photocycle of bacteriorhodopsin. *FEBS Letters*, 109(2):189–193, 1980. ISSN 00145793. doi: 10.1016/0014-5793(80)81083-0. 1.3.4, 4
- H. G. Khorana, G. E. Gerber, W. C. Herlihy, C. P. Gray, R. J. Andereg, K. Nihei, and K. Biemann. Amino acid sequence of bacteriorhodopsin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(10):5046–5050, oct 1979. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.76.10.5046. 1.3
- S. Y. Kim, S. R. Yoon, S. Han, Y. Yun, and K.-H. Jung. A role of Anabaena sensory rhodopsin transducer (ASRT) in photosensory transduction. *Molecular Microbiology*, 93(3):403–414, aug 2014. ISSN 0950382X. doi: 10.1111/mmi.12635. 1.1

- Y. S. Kim, H. E. Kato, K. Yamashita, S. Ito, K. Inoue, C. Ramakrishnan, L. E. Fenno, K. E. Evans, J. M. Paggi, R. O. Dror, H. Kandori, B. K. Kobilka, and K. Deisseroth. Crystal structure of the natural anion-conducting channelrhodopsin GtACR1. *Nature*, 561(7723):343–348, sep 2018. ISSN 0028-0836. doi: 10.1038/s41586-018-0511-6. 1.4.1, 5.5, 5.8.3
- N. C. Klapoetke, Y. Murata, S. S. Kim, S. R. Pulver, A. Birdsey-Benson, Y. K. Cho, T. K. Morimoto, A. S. Chuong, E. J. Carpenter, Z. Tian, J. Wang, Y. Xie, Z. Yan, Y. Zhang, B. Y. Chow, B. Surek, M. Melkonian, V. Jayaraman, M. Constantine-Paton, G. K.-S. Wong, and E. S. Boyden. Independent optical excitation of distinct neural populations. *Nature methods*, 11(3):338–46, 2014. ISSN 1548-7105. doi: 10.1038/nmeth.2836. 1.4, 1.4.3, 1.7, 2, ??, ??, ??, 4.1.2, 4.2.1, 4.2.7, 4.6, 5.1.3, 5.4, 5.4.1, 5.4.2, 5.6, 5.8.1
- S. Kleinlogel, K. Feldbauer, R. E. Dempski, H. Fotis, P. G. Wood, C. Bamann, and E. Bamberg. Ultra light-sensitive and fast neuronal activation with the Ca²⁺-permeable channelrhodopsin CatCh. *Nature Neuroscience*, 14(4):513–518, 2011a. ISSN 1097-6256. doi: 10.1038/nn.2776. 1.4.6, 15, 4.1.1, 5.4.3
- S. Kleinlogel, U. Terpitz, B. Legrum, D. Gökbuget, E. S. Boyden, C. Bamann, P. G. Wood, and E. Bamberg. A gene-fusion strategy for stoichiometric and co-localized expression of light-gated membrane proteins. *Nature Methods*, 8(12):1083–1088, nov 2011b. ISSN 1548-7091. doi: 10.1038/nmeth.1766. ??, 4.6.1, 5.8.3
- E. Kloppmann, T. Becker, and G. M. Ullmann. Electrostatic potential at the retinal of three archaeal rhodopsins: Implications for their different absorption spectra. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 61(4):953–965, 2005. ISSN 08873585. doi: 10.1002/prot.20744. 1.2, 4.2.5
- T. Kobayashi, T. Saito, and H. Ohtani. Real-time spectroscopy of transition states in bacteriorhodopsin during retinal isomerization. *Nature*, 414(6863):531–534, nov 2001. ISSN 0028-0836. doi: 10.1038/35107042. 1.2
- S. Konermann, M. D. Brigham, A. E. Trevino, P. D. Hsu, M. Heidenreich, Le Cong, R. J. Platt, D. A. Scott, G. M. Church, and F. Zhang. Optical control of mammalian endogenous transcription and epigenetic states. *Nature*, 500(7463):472–476, aug 2013. ISSN 0028-0836. doi: 10.1038/nature12466. 1.6
- R. A. Kopton, J. S. Baillie, S. A. Rafferty, R. Moss, C. M. Zgierski-Johnston, S. V. Prykhodzhiy, M. R. Stoyek, F. M. Smith, P. Kohl, T. A. Quinn, and F. Schneider-Warme. Cardiac Electrophysiological Effects of Light-Activated Chloride Channels. *Frontiers in Physiology*, 9, dec 2018. ISSN 1664-042X. doi: 10.3389/fphys.2018.01806. 12
- T. Kouyama, R. Bogomolni, and W. Stoeckenius. Photoconversion from the light-adapted to the dark-adapted state of bacteriorhodopsin. *Biophysical Journal*, 48(2):201–208, aug 1985. ISSN 00063495. doi: 10.1016/S0006-3495(85)83773-5. 5.3.3
- T. Kouyama, T. Nishikawa, T. Tokuhisa, and H. Okumura. Crystal Structure of the L Intermediate of Bacteriorhodopsin: Evidence for Vertical Translocation of a Water Molecule during the Proton Pumping Cycle. *Journal of Molecular Biology*, 335(2):531–546, jan 2004. ISSN 00222836. doi: 10.1016/j.jmb.2003.10.068. 1.3.1
- B. S. Krause. *Spektroskopische Charakterisierung der gruen-absorbierenden Kanalrhodopsinchimaere ReaChR*. Dissertation, Humboldt-Universitaet zu Berlin, 2018. 1.5, 3.5, 4.2.10, 4.16, 5.3, 5.3.2, 8, 5.3.3

- B. S. Krause, C. Grimm, J. C. Kaufmann, F. Schneider, T. P. Sakmar, F. J. Bartl, and P. Hegemann. Complex Photochemistry within the Green-Absorbing Channelrhodopsin ReaChR. *Biophysical Journal*, 112(6): 1166–1175, 2017. ISSN 15420086. doi: 10.1016/j.bpj.2017.02.001. 1.4.2, 1.7, ??, 3.5, 4.2.5
- B. S. Krause, J. C. Kaufmann, J. Kuhne, J. Vierock, T. Huber, T. P. Sakmar, K. Gerwert, F. Bartl, and P. Hegemann. Tracking pore hydration in channelrhodopsin by site-directed infrared-active azido probes. *Biochemistry*, 0(ja):acs.biochem.8b01211, jan 2019. ISSN 0006-2960. doi: 10.1021/acs.biochem.8b01211. 1.4.4, 5.5
- N. Krause, C. Engelhard, J. Heberle, R. Schlesinger, and R. Bittl. Structural differences between the closed and open states of channelrhodopsin-2 as observed by EPR spectroscopy. *FEBS Letters*, 587(20):3309–3313, 2013. ISSN 00145793. doi: 10.1016/j.febslet.2013.08.043. 1.4.4, 5.2.3, 5.5
- J. Kuhne. *Schwingungsspektroskopische Untersuchungen an Channelrhodopsin-2 mithilfe von zeitaufgelöster FTIR- und Raman-Spektroskopie*. Dissertation, Ruhr-Universität Bochum, 2016. 5.4.5
- J. Kuhne, K. Eisenhauer, E. Ritter, P. Hegemann, K. Gerwert, and F. Bartl. Early formation of the ion-conducting pore in channelrhodopsin-2. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 54(16): 4953–7, 2015. ISSN 1521-3773. doi: 10.1002/anie.201410180. 1.4.1, 1.4.3, 1.4.4, 5.2.3, 5.4.5, 5.5, 5.6.1, 5.7.2
- J. Kuhne, J. Vierock, S. A. Tennigkeit, M.-A. Dreier, J. Wietek, D. Petersen, K. Gavriljuk, S. F. El-Mashtoly, P. Hegemann, and K. Gerwert. A unifying photocycle model for light adaptation and temporal evolution of cation conductance in Channelrhodopsin-2. *bioRxiv*, page 503706, jan 2018. doi: 10.1101/503706. 5.2.2
- J. Kuhne, J. Vierock, S. A. Tennigkeit, M.-A. Dreier, J. Wietek, D. Petersen, K. Gavriljuk, S. F. El-Mashtoly, P. Hegemann, and K. Gerwert. Unifying photocycle model for light adaptation and temporal evolution of cation conductance in channelrhodopsin-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, page 201818707, apr 2019. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.1818707116. 5.2.1, 5.2, 5.2.1, 5.2.2, 5.2.3, 5.3.3, 5.4.5, 5.5, 5.6.1, 5.7
- K. Kulleperuma, S. M. E. Smith, D. Morgan, B. Musset, J. Holyoake, N. Chakrabarti, V. V. Cherny, T. E. DeCoursey, and R. Pomès. Construction and validation of a homology model of the human voltage-gated proton channel hHV1. *The Journal of general physiology*, 141(4):445–65, apr 2013. ISSN 1540-7748. doi: 10.1085/jgp.201210856. 1.5
- J. K. Lanyi. Bacteriorhodopsin as a model for proton pumps. *Nature*, 375(6531):461–3, jun 1995. ISSN 0028-0836. doi: 10.1038/375461a0. 1.3
- J. K. Lanyi. Bacteriorhodopsin. *Annual Review of Physiology*, 66(1):665–688, mar 2004. ISSN 0066-4278. doi: 10.1146/annurev.physiol.66.032102.150049. 1.1, 1.3, 1.3.1
- J. K. Lanyi and G. Váró. The Photocycles of Bacteriorhodopsin. *Israel Journal of Chemistry*, 1995. ISSN 18695868. doi: 10.1002/ijch.199500037. 1.3
- L. Lasogga, W. Rettig, H. Otto, I. Wallat, and J. Bricks. Model systems for the investigation of the Opsin shift in Bacteriorhodopsin. *Journal of Physical Chemistry A*, 114(5):2179–2188, 2010. ISSN 10895639. doi: 10.1021/jp904132f. 4.2.5

- J. Le Coutre, J. Tittor, D. Oesterhelt, and K. Gerwert. Experimental evidence for hydrogen-bonded network proton transfer in bacteriorhodopsin shown by Fourier-transform infrared spectroscopy using azide as catalyst. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(11): 4962–6, may 1995. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.92.11.4962. 5.6.1
- T. Leiding, J. Wang, J. Martinsson, W. F. DeGrado, and S. P. Arsköld. Proton and cation transport activity of the M2 proton channel from influenza A virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(35):15409–14, 2010. ISSN 1091-6490. doi: 10.1073/pnas.1009997107. 1.4.6, 5.4.5
- D. G. Levitt, S. R. Elias, and J. M. Hautman. Number of water molecules coupled to the transport of sodium, potassium and hydrogen ions via gramicidin, nonactin or valinomycin. *BBA - Biomembranes*, 512(2): 436–451, 1978. ISSN 00052736. doi: 10.1016/0005-2736(78)90266-3. 1.5
- A. Lewis, J. Spoonhower, R. A. Bogomolni, R. H. Lozier, and W. Stoerkenius. Tunable Laser Resonance Raman Spectroscopy of Bacteriorhodopsin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 71(11): 4462–4466, nov 1974. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.71.11.4462. 1.3.1
- H. Li, E. G. Govorunova, O. a. Sineshchekov, and J. L. Spudich. Role of a helix B lysine residue in the photoactive site in channelrhodopsins. *Biophysical Journal*, 106(8):1607–1617, 2014a. ISSN 15420086. doi: 10.1016/j.bpj.2014.03.002. 1.4.1, 1.4.3, 5.1.1, 1, 5.1.3, 5.3.1, 7
- H. Li, C.-Y. Huang, E. G. Govorunova, C. T. Schafer, O. A. Sineshchekov, M. Wang, L. Zheng, and J. L. Spudich. Crystal structure of a natural light-gated anion channelrhodopsin. *eLife*, 8:e41741, jan 2019. ISSN 2050-084X. doi: 10.7554/eLife.41741. 5.5, 5.8.3
- T. Li, Y. Yang, and C. M. Canessa. A Method for Activation of Endogenous Acid-sensing Ion Channel 1a (ASIC1a) in the Nervous System with High Spatial and Temporal Precision. *Journal of Biological Chemistry*, 289(22):15441–15448, may 2014b. ISSN 0021-9258. doi: 10.1074/jbc.M114.550012. 5.8.4
- X. Li, D. V. Gutierrez, M. G. Hanson, J. Han, M. D. Mark, H. Chiel, P. Hegemann, L. T. Landmesser, and S. Herlitze. Fast noninvasive activation and inhibition of neural and network activity by vertebrate rhodopsin and green algae channelrhodopsin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(49):17816–17821, dec 2005. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.0509030102. 1.6
- Y.-T. Li, Y. Tian, H. Tian, T. Tu, G.-Y. Gou, Q. Wang, Y.-C. Qiao, Y. Yang, and T.-L. Ren. A Review on Bacteriorhodopsin-Based Bioelectronic Devices. *Sensors*, 18(5):1368, apr 2018. ISSN 1424-8220. doi: 10.3390/s18051368. 1.3.2
- J. Y. Lin, M. Z. Lin, P. Steinbach, and R. Y. Tsien. Characterization of Engineered Channelrhodopsin Variants with Improved Properties and Kinetics. *Biophysical Journal*, 96(5):1803–1814, 2009. ISSN 00063495. doi: 10.1016/j.bpj.2008.11.034. 1.4.6, ??, 4.1.2, 5.4.2
- J. Y. Lin, P. M. Knutsen, A. Muller, D. Kleinfeld, and R. Y. Tsien. ReaChR: a red-shifted variant of channelrhodopsin enables deep transcranial optogenetic excitation. *Nature neuroscience*, 16(10):1499–508, 2013. ISSN 1546-1726. doi: 10.1038/nn.3502. 1.7, 13, ??, 4.6.1
- C. Lind, B. Höjeberg, and H. G. Khorana. Reconstitution of delipidated bacteriorhodopsin with endogenous polar lipids. *The Journal of biological chemistry*, 256(16):8298–305, aug 1981. ISSN 0021-9258. 5.3.1

- R. S. Liu and A. E. Asato. The primary process of vision and the structure of bathorhodopsin: a mechanism for photoisomerization of polyenes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(2):259–63, jan 1985. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.82.2.259. 9
- I. Logunov, W. Humphrey, K. Schulten, and M. Sheves. Molecular dynamics study of the 13-cis form (bR548) of bacteriorhodopsin and its photocycle. *Biophysical Journal*, 68(4):1270–1282, apr 1995. ISSN 00063495. doi: 10.1016/S0006-3495(95)80301-2. 5.4.5
- V. a. Lórenz-Fonfría and J. Heberle. Channelrhodopsin unchained: Structure and mechanism of a light-gated cation channel. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1837(5):626–642, 2014. ISSN 18792650. doi: 10.1016/j.bbabi.2013.10.014. 1.4.2, 1.4.3, 1.4.4, 5.2.2, 5.2.3, 5.6.2
- V. A. Lórenz-Fonfría and H. Kandori. Spectroscopic and kinetic evidence on how bacteriorhodopsin accomplishes vectorial proton transport under functional conditions. *Journal of the American Chemical Society*, 131(16):5891–901, apr 2009. ISSN 1520-5126. doi: 10.1021/ja900334c. 1.3.1
- V. A. Lórenz-Fonfría, T. Resler, N. Krause, M. Nack, M. Gossing, G. Fischer von Mollard, C. Bamann, E. Bamberg, R. Schlesinger, and J. Heberle. Transient protonation changes in channelrhodopsin-2 and their relevance to channel gating. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(14):E1273–81, 2013. ISSN 1091-6490. doi: 10.1073/pnas.1219502110. 9, 1.4.3, 1.4.4, 1.4.5, 5.2.1, 5.2.2, 5.2.3, 5, 5.3.2, 5.3.3, 5.4.4, 5.4.5, 5.6.1, 5.7.2
- V. A. Lórenz-Fonfría, V. Muders, R. Schlesinger, and J. Heberle. Changes in the hydrogen-bonding strength of internal water molecules and cysteine residues in the conductive state of channelrhodopsin-1. *The Journal of Chemical Physics*, 141(22):22D507, 2014. ISSN 0021-9606. doi: 10.1063/1.4895796. 4.5.1
- V. A. Lórenz-Fonfría, C. Bamann, T. Resler, R. Schlesinger, E. Bamberg, and J. Heberle. Temporal evolution of helix hydration in a light-gated ion channel correlates with ion conductance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(43):E5796–E5804, oct 2015a. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.1511462112. 1.4.2, 1.4.4, 5.2.1, 5.2.1, 5.4.4, 5.4.5
- V. a. Lórenz-Fonfría, B.-J. Schultz, T. Resler, R. Schlesinger, C. Bamann, E. Bamberg, and J. Heberle. Pre-gating conformational changes in the ChETA variant of channelrhodopsin-2 monitored by nanosecond IR spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, 137(5):1850–61, 2015b. ISSN 1520-5126. doi: 10.1021/ja5108595. 3
- V. A. Lorenz-Fonfría, M. Saita, T. Lazarova, R. Schlesinger, and J. Heberle. pH-sensitive vibrational probe reveals a cytoplasmic protonated cluster in bacteriorhodopsin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(51):E10909–E10918, dec 2017. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.1707993114. 1.3.1
- E. Lörinczi, M.-K. Verhoefen, J. Wachtveitl, A. C. Woerner, C. Glaubitz, M. Engelhard, E. Bamberg, and T. Friedrich. Voltage- and pH-dependent changes in vectoriality of photocurrents mediated by wild-type and mutant proteorhodopsins upon expression in *Xenopus* oocytes. *Journal of molecular biology*, 393(2):320–41, oct 2009. ISSN 1089-8638. doi: 10.1016/j.jmb.2009.07.055. 1.3.4, 5.3.2, 5.7.1, 5.7.3
- M. Luck, T. Mathes, S. Bruun, R. Fudim, R. Hagedorn, T. M. Tran Nguyen, S. Kateriya, J. T. M. Kennis, P. Hildebrandt, and P. Hegemann. A Photochromic Histidine Kinase Rhodopsin (HKR1) That Is Bimodally Switched by Ultraviolet and Blue Light. *Journal of Biological Chemistry*, 287(47):40083–40090, nov 2012. ISSN 0021-9258. doi: 10.1074/jbc.M112.401604. 1.1, 1, 3.2.3

- H. Luecke. Crystal Structure of Sensory Rhodopsin II at 2.4 Angstroms: Insights into Color Tuning and Transducer Interaction. *Science*, 293(5534):1499–1503, 2001. ISSN 00368075. doi: 10.1126/science.1062977. 5.1.2
- H. Luecke, H. T. Richter, and J. K. Lanyi. Proton transfer pathways in bacteriorhodopsin at 2.3 angstrom resolution. *Science (New York, N.Y.)*, 280(5371):1934–7, jun 1998. ISSN 0036-8075. doi: 10.1126/science.280.5371.1934. 1.2, 4.2.7
- H. Luecke, B. Schobert, H. T. Richter, J. P. Cartailier, and J. K. Lanyi. Structural Changes in Bacteriorhodopsin During Ion Transport at 2 Angstrom Resolution. *Science*, 286(5438):255–260, 1999a. doi: 10.1126/science.286.5438.255. 1.3.1
- H. Luecke, B. Schobert, H. T. Richter, J. P. Cartailier, and J. K. Lanyi. Structure of bacteriorhodopsin at 1.55 Å resolution. *Journal of molecular biology*, 291(4):899–911, aug 1999b. ISSN 0022-2836. doi: 10.1006/jmbi.1999.3027. 1.3, 1.3.1, 5.1, 5.1.4, 5.3.4
- H. Luecke, B. Schobert, J. P. Cartailier, H. T. Richter, A. Rosengarth, R. Needleman, and J. K. Lanyi. Coupling photoisomerization of retinal to directional transport in bacteriorhodopsin. *Journal of molecular biology*, 300(5):1237–55, jul 2000. ISSN 0022-2836. doi: 10.1006/jmbi.2000.3884. 1.3.1, 5.4.4, 5.6.1, 5.7.2
- H. Luecke, B. Schobert, J. Stagno, E. S. Imasheva, J. M. Wang, S. P. Balashov, and J. K. Lanyi. Crystallographic structure of xanthorhodopsin, the light-driven proton pump with a dual chromophore. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(43):16561–16565, oct 2008. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.0807162105. 1.3.3
- S. M. Luria and J. A. Kinney. Underwater vision. *Science (New York, N.Y.)*, 167(3924):1454–61, mar 1970. ISSN 0036-8075. doi: 10.1126/science.167.3924.1454. 1.7
- T. Mager, P. G. Wood, and E. Bamberg. Optogenetic Control of Ca²⁺ and Voltage-Dependent Large Conductance (BK) Potassium Channels. *Journal of Molecular Biology*, 429(6):911–921, mar 2017. ISSN 00222836. doi: 10.1016/j.jmb.2017.02.004. 5.8.4
- T. Mager, D. Lopez de la Morena, V. Senn, J. Schlotte, A. D’Errico, K. Feldbauer, C. Wrobel, S. Jung, K. Bodensiek, V. Rankovic, L. Browne, A. Huet, J. Jüttner, P. G. Wood, J. J. Letzkus, T. Moser, and E. Bamberg. High frequency neural spiking and auditory signaling by ultrafast red-shifted optogenetics. *Nature Communications*, 9(1):1750, 2018. ISSN 2041-1723. doi: 10.1038/s41467-018-04146-3. 15, 11, 5.6
- M. Mahn, M. Prigge, S. Ron, R. Levy, and O. Yizhar. Biophysical constraints of optogenetic inhibition at presynaptic terminals. *Nature Neuroscience*, 19(4):554–556, apr 2016. ISSN 1097-6256. doi: 10.1038/nn.4266. 12, 5.4.2
- M. Mahn, L. Gibor, P. Patil, K. Cohen-Kashi Malina, S. Oring, Y. Printz, R. Levy, I. Lampl, and O. Yizhar. High-efficiency optogenetic silencing with soma-targeted anion-conducting channelrhodopsins. *Nature Communications*, 9(1):4125, dec 2018. ISSN 2041-1723. doi: 10.1038/s41467-018-06511-8. 5.8.3
- G. I. Makhatadze and P. L. Privalov. Protein interactions with urea and guanidinium chloride. A calorimetric study. *Journal of molecular biology*, 226(2):491–505, jul 1992. ISSN 0022-2836. doi: 10.1016/0022-2836(92)90963-K. 5.4.3

- A. Malyshev, M. Roshchin, G. Smirnova, D. Dolgikh, P. Balaban, and M. Ostrovsky. Chloride conducting light activated channel GtACR2 can produce both cessation of firing and generation of action potentials in cortical neurons in response to light. *Neuroscience Letters*, 640:76–80, feb 2017. ISSN 03043940. doi: 10.1016/j.neulet.2017.01.026. 12
- O. Markovitch, H. Chen, S. Izvekoy, F. Paesani, G. A. Voth, and N. Agmon. Special Pair Dance and Partner Selection: Elementary Steps in Proton Transport in Liquid Water. *The Journal of Physical Chemistry B*, 112(31):9456–9466, aug 2008. ISSN 1520-6106. doi: 10.1021/jp804018y. 1.5
- T. Marti, H. Otto, T. Mogi, S. J. Rösselet, M. P. Heyn, and H. G. Khorana. Bacteriorhodopsin mutants containing single substitutions of serine or threonine residues are all active in proton translocation. *The Journal of biological chemistry*, 266(11):6919–27, apr 1991. ISSN 0021-9258. 1.2, 4.2.5, 5.1.4, 5.3.4, 5.6.1
- G. Martínez-Rosell, T. Giorgino, and G. De Fabritiis. PlayMolecule ProteinPrepare: A Web Application for Protein Preparation for Molecular Dynamics Simulations. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2017. ISSN 15205142. doi: 10.1021/acs.jcim.7b00190. A.7
- Y. Matsui, K. Sakai, M. Murakami, Y. Shiro, S. I. Adachi, H. Okumura, and T. Kouyama. Specific damage induced by X-ray radiation and structural changes in the primary photoreaction of bacteriorhodopsin. *Journal of molecular biology*, 324(3):469–81, nov 2002. ISSN 0022-2836. doi: 10.1016/S0022-2836(02)01110-5. 1.3.1
- G. Metz, F. Siebert, and M. Engelhard. Asp85 is the only internal aspartic acid that gets protonated in the M intermediate and the purple-to-blue transition of bacteriorhodopsin. A solid-state ¹³C CP-MAS NMR investigation. *FEBS letters*, 303(2-3):237–41, jun 1992. ISSN 0014-5793. doi: 10.1016/0014-5793(92)80528-O. 5.1.4
- H. Meuzelaar, M. R. Panman, and S. Woutersen. Guanidinium-Induced Denaturation by Breaking of Salt Bridges. *Angewandte Chemie International Edition*, 54(50):15255–15259, dec 2015. ISSN 14337851. doi: 10.1002/anie.201508601. 5.4.4
- G. Miesenböck, D. A. De Angelis, and J. E. Rothman. Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature*, 394(6689):192–195, 1998. ISSN 00280836. doi: 10.1038/28190. 1.6, 3.4.1
- M. J. Miller, M. Oldenburg, and R. H. Fillingame. The essential carboxyl group in subunit c of the F1F0 ATP synthase can be moved and H(+)-translocating function retained. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(13):4900–4904, 1990. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.87.13.4900. 4.4
- T. Mogi, L. J. Stern, T. Marti, B. H. Chao, and H. G. Khorana. Aspartic acid substitutions affect proton translocation by bacteriorhodopsin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(12):4148–4152, 1988. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.85.12.4148. 4.2.6
- D. Morgan, B. Musset, K. Kulleperuma, S. M. E. Smith, S. Rajan, V. V. Cherny, R. Pomès, and T. E. DeCoursey. Peregrination of the selectivity filter delineates the pore of the human voltage-gated proton channel hHV1. *The Journal of general physiology*, 142(6):625–40, dec 2013. ISSN 1540-7748. doi: 10.1085/jgp.201311045. 5.4.4

- M. Müller, C. Bamann, E. Bamberg, and W. Kühlbrandt. Projection structure of channelrhodopsin-2 at 6 Å resolution by electron crystallography. *Journal of Molecular Biology*, 414(1):86–95, 2011. ISSN 00222836. doi: 10.1016/j.jmb.2011.09.049. 1.4.1, 1.4.1
- M. Müller, C. Bamann, E. Bamberg, and W. Kühlbrandt. Light-induced helix movements in channelrhodopsin-2. *Journal of molecular biology*, 427(2):341–9, 2015. ISSN 1089-8638. doi: 10.1016/j.jmb.2014.11.004. 1.4.4, 5.5
- K. Mullis, F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, and H. Erlich. Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51:263–273, jan 1986. ISSN 0091-7451. doi: 10.1101/SQB.1986.051.01.032. 3.1.3
- B. Musset, S. M. E. Smith, S. Rajan, D. Morgan, V. V. Cherny, and T. E. Decoursey. Aspartate 112 is the selectivity filter of the human voltage-gated proton channel. *Nature*, 480(7376):273–7, 2011. ISSN 1476-4687. doi: 10.1038/nature10557. 1.5, 4.4, 5.4.4
- V. B. Myers and D. A. Haydon. Ion transfer across lipid membranes in the presence of gramicidin A. II. The ion selectivity. *BBA - Biomembranes*, 274(2):313–322, aug 1972. ISSN 00052736. doi: 10.1016/0005-2736(72)90179-4. 1.4.6, 1.5, 5.4.4
- M. Nack, I. Radu, C. Bamann, E. Bamberg, and J. Heberle. The retinal structure of channelrhodopsin-2 assessed by resonance Raman spectroscopy. *FEBS Letters*, 583(22):3676–3680, 2009. ISSN 00145793. doi: 10.1016/j.febslet.2009.10.052. 3
- M. Nack, I. Radu, M. Gossing, C. Bamann, E. Bamberg, G. F. von Mollard, and J. Heberle. The DC gate in Channelrhodopsin-2: crucial hydrogen bonding interaction between C128 and D156. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 9(2):194–198, 2010. ISSN 1474-905X. doi: 10.1039/b9pp00157c. 1.4.1
- M. Nack, I. Radu, B.-J. J. Schultz, T. Resler, R. Schlesinger, A.-N. N. Bondar, C. del Val, S. Abbruzzetti, C. Viappiani, C. Bamann, Others, E. Bamberg, and J. Heberle. Kinetics of proton release and uptake by channelrhodopsin-2. *FEBS letters*, 586(9):1344–1348, 2012. ISSN 00145793. doi: 10.1016/j.febslet.2012.03.047. 1.4.2, 1.4.3, 5.2.1, 5.7.2
- G. Nagel, B. Möckel, G. Büldt, and E. Bamberg. Functional expression of bacteriorhodopsin in oocytes allows direct measurement of voltage dependence of light induced H⁺ pumping. *FEBS letters*, 377(2): 263–6, dec 1995. ISSN 0014-5793. doi: 10.1016/0014-5793(95)01356-3. 1.3.4
- G. Nagel, B. Kelety, B. Möckel, G. Büldt, and E. Bamberg. Voltage dependence of proton pumping by bacteriorhodopsin is regulated by the voltage-sensitive ratio of M1 to M2. *Biophysical journal*, 74(1): 403–12, jan 1998. ISSN 0006-3495. doi: 10.1016/S0006-3495(98)77797-5. 1.3.4, 5.6.1
- G. Nagel, D. Ollig, M. Fuhrmann, S. Kateriya, A. M. Musti, E. Bamberg, and P. Hegemann. Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae. *Science (New York, N.Y.)*, 296(5577): 2395–8, jun 2002. ISSN 1095-9203. doi: 10.1126/science.1072068. 1.1, 1.4, 1.4.6
- G. Nagel, T. Szellas, W. Huhn, S. Kateriya, N. Adeishvili, P. Berthold, D. Ollig, P. Hegemann, and E. Bamberg. Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(24):13940–5, 2003. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.1936192100. 1.1, 1.4, 1.4.5, 1.4.6, 1.7, 2, ??, 16, 4.1.1, 4.2.3, 4.2.11, 5.2.2, 5.3.4, 5.4.3, 5.4.5

- G. Nagel, S. Ullrich, and R. Gueta. Degradation of channelopsin-2 in the absence of retinal and degradation resistance in certain mutants. *Biological Chemistry*, 394(2):271–280, 2013. ISSN 14316730. doi: 10.1515/hsz-2012-0256. 1.4.1
- J. F. Nagle and H. J. Morowitz. Molecular mechanisms for proton transport in membranes. *Proceedings of the National*, 75(1):298–302, 1978. ISSN 1091-6490. doi: 10.1073/pnas.1219502110. 1.5
- J. Nakai, M. Ohkura, and K. Imoto. A high signal-to-noise Ca²⁺ probe composed of a single green fluorescent protein. *Nature Biotechnology*, 19(2):137–141, feb 2001. ISSN 1087-0156. doi: 10.1038/84397. 1.6
- K. Nakanishi, V. Balogh-Nair, M. Arnaboldi, K. Tsujimoto, and B. Honig. An external point-charge model for bacteriorhodopsin to account for its purple color. *Journal of the American Chemical Society*, 102(27):7945–7947, dec 1980. ISSN 0002-7863. doi: 10.1021/ja00547a028. 1.2
- E. Nango, A. Royant, M. Kubo, T. Nakane, C. Wickstrand, T. Kimura, T. Tanaka, K. Tono, C. Song, R. Tanaka, T. Arima, A. Yamashita, J. Kobayashi, T. Hosaka, E. Mizohata, P. Nogly, M. Sugahara, D. Nam, T. Nomura, T. Shimamura, D. Im, T. Fujiwara, Y. Yamanaka, B. Jeon, T. Nishizawa, K. Oda, M. Fukuda, R. Andersson, P. B ath, R. Dods, J. Davidsson, S. Matsuoka, S. Kawatake, M. Murata, O. Nureki, S. Owada, T. Kameshima, T. Hatsui, Y. Joti, G. Schertler, M. Yabashi, A.-N. Bondar, J. Standfuss, R. Neutze, and S. Iwata. A three-dimensional movie of structural changes in bacteriorhodopsin. *Science*, 354(6319):1552–1557, 2016. ISSN 0036-8075. doi: 10.1126/science.aah3497. 1.3, 1.3.1, 5.2.1, 5.9
- E. Neher. Correction for liquid junction potentials in patch clamp experiments. *Methods in Enzymology*, 207(C):123–131, 1992. ISSN 15577988. doi: 10.1016/0076-6879(92)07008-C. 3.13
- E. Neher, B. Sakmann, and J. H. Steinbach. The extracellular patch clamp: A method for resolving currents through individual open channels in biological membranes. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 375(2):219–228, 1978. ISSN 00316768. doi: 10.1007/BF00584247. 3.3
- K. Nehrke. Intracellular pH measurements in vivo using green fluorescent protein variants. *Methods Mol Biol*, 351:223–239, 2006. ISSN 1064-3745. doi: 1-59745-151-7:223[pil]r10.1385/1-59745-151-7:223. 3.4.2
- M. Neitz, J. Neitz, and G. H. Jacobs. Spectral tuning of pigments underlying red-green color vision. *Science (New York, N.Y.)*, 252(5008):971–4, may 1991. ISSN 0036-8075. doi: 10.1126/science.1903559. 5.1
- J. P. Newman, M.-f. Fong, D. C. Millard, C. J. Whitmire, G. B. Stanley, and S. M. Potter. Optogenetic feedback control of neural activity. *eLife*, 4, jul 2015. ISSN 2050-084X. doi: 10.7554/eLife.07192. 5.8.3
- A. Niho, S. Yoshizawa, T. Tsukamoto, M. Kurihara, S. Tahara, Y. Nakajima, M. Mizuno, H. Kuramochi, T. Tahara, Y. Mizutani, and Y. Sudo. Demonstration of a Light-Driven SO₄²⁻ Transporter and Its Spectroscopic Characteristics. *Journal of the American Chemical Society*, 139(12):4376–4389, mar 2017. ISSN 0002-7863. doi: 10.1021/jacs.6b12139. 1.1
- K. Nikolic, N. Grossman, M. S. Grubb, J. Burrone, C. Toumazou, and P. Degenaar. Photocycles of Channelrhodopsin-2. *Photochemistry and Photobiology*, 85(1):400–411, 2009. ISSN 00318655. doi: 10.1111/j.1751-1097.2008.00460.x. 1.6, 1.4.5, 5.2.2, 5.3.3

- T. Nishikawa, M. Murakami, and T. Kouyama. Crystal structure of the 13-cis isomer of bacteriorhodopsin in the dark-adapted state. *Journal of molecular biology*, 352(2):319–28, sep 2005. ISSN 0022-2836. doi: 10.1016/j.jmb.2005.07.021. 1.3.2
- P. Nogly, T. Weinert, D. James, S. Carbajo, D. Ozerov, A. Furrer, D. Gashi, V. Borin, P. Skopintsev, K. Jaeger, K. Nass, P. Báth, R. Bosman, J. Koglin, M. Seaberg, T. Lane, D. Kekilli, S. Brünle, T. Tanaka, W. Wu, C. Milne, T. White, A. Barty, U. Weierstall, V. Panneels, E. Nango, S. Iwata, M. Hunter, I. Schapiro, G. Schertler, R. Neutze, and J. Standfuss. Retinal isomerization in bacteriorhodopsin captured by a femtosecond x-ray laser. *Science*, 361(6398):1–15, 2018. ISSN 10959203. doi: 10.1126/science.aat0094. 1.3, 1.3.1, 5.3.2, 5.9
- C. Nonnengässer, E. M. Holland, H. Harz, and P. Hegemann. The nature of rhodopsin-triggered photocurrents in *Chlamydomonas*. II. Influence of monovalent ions. *Biophysical journal*, 70(2):932–8, 1996. ISSN 0006-3495. doi: 10.1016/S0006-3495(96)79636-4. 5.4.3
- K. Oda, J. Vierock, S. Oishi, S. Rodriguez-Rozada, R. Taniguchi, K. Yamashita, J. S. Wiegert, T. Nishizawa, P. Hegemann, and O. Nureki. Crystal structure of the red light-activated channelrhodopsin Chrimson. *Nature Communications*, 9(1):3949, 2018. ISSN 2041-1723. doi: 10.1038/s41467-018-06421-9. 1.4.1, 2, ??, 4.2.1, 4.2.4, 4.10, 4.2.5, 4.11, 4.12, 4.13, 4.5.3, 5, 5.1, 5.1, 5.1.3, 5.1.4, 5.3.1, 6, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8.2, 5.8.3, A.7
- D. Oesterhelt and W. Stoerkenius. Rhodopsin-like Protein from the Purple Membrane of *Halobacterium halobium*. *Nature New Biology*, 233(39):149–152, sep 1971. ISSN 0090-0028. doi: 10.1038/newbio233149a0. 1.1, 1.3.2, 5.3.1
- D. Oesterhelt, M. Meentzen, and L. Schuhmann. Reversible Dissociation of the Purple Complex in Bacteriorhodopsin and Identification of 13-cis and all-trans-Retinal as its Chromophores. *European Journal of Biochemistry*, 40(2):453–463, dec 1973. ISSN 0014-2956. doi: 10.1111/j.1432-1033.1973.tb03214.x. 5.3.3
- D. Ogden. Microelectrode electronics. In *Microelectrode Techniques, The Plymouth workshop handbook*, volume 2nd. Company of Biologists Cambridge, UK, 1994. 9
- J. I. Ogren, A. Yi, S. Mamaev, H. Li, J. Lugtenburg, W. J. DeGrip, J. L. Spudich, and K. J. Rothschild. Comparison of the Structural Changes Occurring during the Primary Phototransition of Two Different Channelrhodopsins from *Chlamydomonas* Algae. *Biochemistry*, 54(2):377–388, jan 2015a. ISSN 0006-2960. doi: 10.1021/bi501243y. 1.4.3, 5.3.2
- J. I. Ogren, A. Yi, S. Mamaev, H. Li, J. L. Spudich, and K. J. Rothschild. Proton Transfers in a Channelrhodopsin-1 Studied by Fourier Transform Infrared (FTIR) Difference Spectroscopy and Site-directed Mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 290(20):12719–12730, 2015b. ISSN 0021-9258. doi: 10.1074/jbc.M114.634840. 1.4.3, 5.3.2
- K. Ohno, Y. Takeuchi, and M. Yoshida. Effect of light-adaptation on the photoreaction of bacteriorhodopsin from *Halobacterium halobium*. *Biochimica et biophysica acta*, 462(3):575–82, dec 1977. ISSN 0006-3002. doi: 10.1016/0005-2728(77)90102-5. 1.3.2
- H. Okumura, M. Murakami, and T. Kouyama. Crystal structures of acid blue and alkaline purple forms of bacteriorhodopsin. *Journal of molecular biology*, 351(3):481–95, aug 2005. ISSN 0022-2836. doi: 10.1016/j.jmb.2005.06.026. 5.1.4

- C. Oliva, I. S. Cohen, and R. T. Mathias. Calculation of time constants for intracellular diffusion in whole cell patch clamp configuration. *Biophysical journal*, 54(5):791–799, 1988. ISSN 00063495. doi: 10.1016/S0006-3495(88)83017-0. 5.4.2
- A. Pascher. *Die Süßwasser-Flora Deutschlands, Oesterreichs und der Schweiz*. Jena : G. Fischer, 1927. 1.7
- H. Patzelt, B. Simon, A. TerLaak, B. Kessler, R. Kühne, P. Schmieder, D. Oesterhelt, H. Oschkinat, and R. Ku. The structures of the active center in dark-adapted bacteriorhodopsin by solution-state NMR spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(15):9765–70, 2002. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.132253899. 5.6.2, 18
- S. N. Peirson, L. A. Brown, C. A. Potheary, L. A. Benson, and A. S. Fisk. Light and the laboratory mouse. *Journal of neuroscience methods*, 300:26–36, apr 2018. ISSN 1872-678X. doi: 10.1016/j.jneumeth.2017.04.007. 1.7
- A. Perálvarez-Marín, M. Márquez, J.-L. Bourdelande, E. Querol, and E. Padrós. Thr-90 Plays a Vital Role in the Structure and Function of Bacteriorhodopsin. *Journal of Biological Chemistry*, 279(16):16403–16409, apr 2004. ISSN 0021-9258. doi: 10.1074/jbc.M313988200. 5.3.4
- L. E. Petrovskaya, S. P. Balashov, E. P. Lukashev, E. S. Imasheva, I. Y. Gushchin, A. K. Dioumaev, A. B. Rubin, D. A. Dolgikh, V. I. Gordeliy, J. K. Lanyi, and M. P. Kirpichnikov. ESR — A retinal protein with unusual properties from *Exiguobacterium sibiricum*. *Biochemistry (Moscow)*, 80(6):688–700, jun 2015. ISSN 0006-2979. doi: 10.1134/S000629791506005X. 5.1.1
- V. Philip, J. Harris, R. Adams, D. Nguyen, J. Spiers, J. Baudry, E. E. Howell, and R. J. Hinde. A survey of aspartate-phenylalanine and glutamate-phenylalanine interactions in the protein data bank: searching for anion-pi pairs. *Biochemistry*, 50(14):2939–2950, 2011. ISSN 1520-4995. doi: 10.1021/bi200066k. 5.1.1
- K. D. Piatkevich, E. E. Jung, C. Straub, C. Linghu, D. Park, H.-J. Suk, D. R. Hochbaum, D. Goodwin, E. Pnevmatikakis, N. Pak, T. Kawashima, C.-T. Yang, J. L. Rhoades, O. Shemesh, S. Asano, Y.-G. Yoon, L. Freifeld, J. L. Saulnier, C. Riegler, F. Engert, T. Hughes, M. Drobizhev, B. Szabo, M. B. Ahrens, S. W. Flavell, B. L. Sabatini, and E. S. Boyden. A robotic multidimensional directed evolution approach applied to fluorescent voltage reporters. *Nature chemical biology*, 14(4):352–360, apr 2018. ISSN 1552-4469. doi: 10.1038/s41589-018-0004-9. 5.9
- J. Pinhassi, E. F. DeLong, O. Béjà, J. M. González, and C. Pedrós-Alió. Marine Bacterial and Archaeal Ion-Pumping Rhodopsins: Genetic Diversity, Physiology, and Ecology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(4):929–954, 2016. ISSN 1092-2172. doi: 10.1128/MMBR.00003-16. 1.1
- D. Platzer and K. Zorn-Pauly. Letter to the editor: Accurate cell capacitance determination from a single voltage step: a reminder to avoid unnecessary pitfalls. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 311(4):H1072–H1073, 2016. ISSN 0363-6135. doi: 10.1152/ajpheart.00503.2016. 3.6.1
- A. P. Plazzo, N. De Franceschi, F. Da Broi, F. Zonta, M. F. Sanasi, F. Filippini, and M. Mongillo. Bioinformatic and Mutational Analysis of Channelrhodopsin-2 Protein Cation-conducting Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 287(7):4818–4825, 2012. ISSN 0021-9258. doi: 10.1074/jbc.M111.326207. 5.4.3

- R. Pomès, B. Roux, and R. Pomes. Structure and dynamics of a proton wire: a theoretical study of H⁺ translocation along the single-file water chain in the gramicidin A channel. *Biophysical journal*, 71 (July):19–39, 1996. ISSN 0006-3495. doi: 10.1016/S0006-3495(96)79211-1. 1.5
- A. Popp, M. Wolperdinger, N. Hampp, C. Brüche, and D. Oesterhelt. Photochemical conversion of the O-intermediate to 9-cis-retinal-containing products in bacteriorhodopsin films. *Biophysical journal*, 65 (4):1449–59, oct 1993. ISSN 0006-3495. doi: 10.1016/S0006-3495(93)81214-1. 1.3.2, 5.3, 5.3.5
- M. Prigge. *Über die elektrophysiologische Untersuchung und Entwicklung von farbverschobenen Kanalrhodopsinchimären aus der Grünalge Volvox carteri*. PhD thesis, Humboldt-Universität zu Berlin, 2012. 3.6.1
- M. Prigge, F. Schneider, S. P. Tsunoda, C. Shilyansky, J. Wietek, K. Deisseroth, and P. Hegemann. Color-tuned Channelrhodopsins for Multiwavelength Optogenetics. *Journal of Biological Chemistry*, 287(38): 31804–31812, 2012. ISSN 0021-9258. doi: 10.1074/jbc.M112.391185. 1.7, 13, 3.4.2, 5.1.3, 5.6.2
- M. Pusch and E. Neher. Rates of diffusional exchange between small cells and a measuring patch pipette. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*, 411(2):204–11, feb 1988. ISSN 0031-6768. 3.3.3, 5.4.2
- I. Radu, C. Bamann, M. Nack, G. Nagel, E. Bamberg, and J. Heberle. Conformational changes of channelrhodopsin-2. *Journal of the American Chemical Society*, 131(21):7313–7319, 2009. ISSN 00027863. doi: 10.1021/ja8084274. 1.4.4, 5.2.3
- P. Rajasethupathy, S. Sankaran, J. H. Marshel, C. K. Kim, E. Ferenczi, S. Y. Lee, A. Berndt, C. Ramakrishnan, A. Jaffe, M. Lo, C. Liston, and K. Deisseroth. Projections from neocortex mediate top-down control of memory retrieval. *Nature*, 526(7575):653–9, 2015. ISSN 0028-0836. doi: 10.1038/nature15389. 5.1.1
- J. Rajput, D. B. Rahbek, L. H. Andersen, A. Hirshfeld, M. Sheves, P. Altoè, G. Orlandi, and M. Garavelli. Probing and Modeling the Absorption of Retinal Protein Chromophores in Vacuo. *Angewandte Chemie International Edition*, 49(10):1790–1793, mar 2010. ISSN 14337851. doi: 10.1002/anie.200905061. 1.2
- R. Rammelsberg, G. Huhn, M. Lübben, and K. Gerwert. Bacteriorhodopsin’s Intramolecular Proton-Release Pathway Consists of a Hydrogen-Bonded Network. *Biochemistry*, 37(14):5001–5009, apr 1998. ISSN 0006-2960. doi: 10.1021/bi971701k. 1.3.1
- I. S. Ramsey, Y. Mokrab, I. Carvacho, Z. A. Sands, M. S. P. Sansom, and D. E. Clapham. An aqueous H⁺ permeation pathway in the voltage-gated proton channel Hv1. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17(7):869–875, jul 2010. ISSN 1545-9993. doi: 10.1038/nsmb.1826. 1.5
- M. J. Ranaghan, J. A. Greco, N. L. Wagner, R. Grewal, R. Rangarajan, J. F. Koscielcki, K. J. Wise, and R. R. Birge. Photochromic Bacteriorhodopsin Mutant with High Holographic Efficiency and Enhanced Stability via a Putative Self-Repair Mechanism. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 6(4):2799–2808, feb 2014. ISSN 1944-8244. doi: 10.1021/am405363z. 1.3.2, 5.3.5
- T. Resler, B.-J. Schultz, V. Lórenz-Fonfría, R. Schlesinger, and J. Heberle. Kinetic and Vibrational Isotope Effects of Proton Transfer Reactions in Channelrhodopsin-2. *Biophysical Journal*, 109(2):287–297, 2015. ISSN 00063495. doi: 10.1016/j.bpj.2015.06.023. 5.6.1
- H.-T. Richter, R. Needleman, H. Kandori, A. Maeda, and J. K. Lanyi. Relationship of Retinal Configuration and Internal Proton Transfer at the End of the Bacteriorhodopsin Photocycle †. *Biochemistry*, 35(48): 15461–15466, jan 1996. ISSN 0006-2960. doi: 10.1021/bi9612430. 1.3.1

- T. J. Rink, R. Y. Tsien, and T. Pozzan. Cytoplasmic pH and free Mg²⁺ in lymphocytes. *Journal of Cell Biology*, 95(1):189–196, 1982. ISSN 00219525. doi: 10.1083/jcb.95.1.189. 3.4.1
- E. Ritter, K. Stehfest, A. Berndt, P. Hegemann, and F. J. Bartl. Monitoring Light-induced Structural Changes of Channelrhodopsin-2 by UV-visible and Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Journal of Biological Chemistry*, 283(50):35033–35041, dec 2008. ISSN 0021-9258. doi: 10.1074/jbc.M806353200. 1.4.2, 1.4.2, 1.4.3, 1.4.4, 1.4.5, 5.1.2, 5.2.1, 5.2, 5.2.2, 5.2.3, 5.3.2, 5.4.5, 5.7.2
- E. Ritter, P. Piwowarski, P. Hegemann, and F. J. Bartl. Light-dark Adaptation of Channelrhodopsin C128T Mutant. *Journal of Biological Chemistry*, 288(15):10451–10458, apr 2013. ISSN 0021-9258. doi: 10.1074/jbc.M112.446427. 1.4.5, 4.2.11, 3, 5.3.3
- R. A. Robinson and R. H. Stokes. *Electrolyte solutions*. Dover Publications Inc., 2nd edition, 2002. ISBN 10: 0486422259. 1.5
- A. Rösler. *Etablierung der Methode der Zeitaufgelösten Fluoreszenzbildgebung zur Messung von Kalzium- und Protonen-Fluxe durch das Licht-aktivierbare Kanalrhodopsin 2*. Diplomarbeit, Humboldt-Universität zu Berlin, 2008. 3.4.1, 9
- B. R. Rost, F. Schneider, M. K. Grauel, C. Wozny, C. G Bentz, A. Blessing, T. Rosenmund, T. J. Jentsch, D. Schmitz, P. Hegemann, and C. Rosenmund. Optogenetic acidification of synaptic vesicles and lysosomes. *Nature Neuroscience*, 18(12):1845–1852, dec 2015. ISSN 1097-6256. doi: 10.1038/nn.4161. ??
- B. R. Rost, F. Schneider-Warme, D. Schmitz, and P. Hegemann. Optogenetic Tools for Subcellular Applications in Neuroscience. *Neuron*, 96(3):572–603, nov 2017. ISSN 08966273. doi: 10.1016/j.neuron.2017.09.047. 1.6
- I. Rouso, N. Friedman, M. Sheves, and M. Ottolenghi. pKa of the Protonated Schiff Base and Aspartic 85 in the Bacteriorhodopsin Binding Site Is Controlled by a Specific Geometry between the Two Residues. *Biochemistry*, 34(37):12059–12065, sep 1995. ISSN 0006-2960. doi: 10.1021/bi00037a049. 1.3.1
- A. Royant, K. Edman, T. Ursby, E. Pebay-Peyroula, E. M. Landau, and R. Neutze. Helix deformation is coupled to vectorial proton transport in the photocycle of bacteriorhodopsin. *Nature*, 406(6796):645–648, aug 2000. ISSN 0028-0836. doi: 10.1038/35020599. 1.3.1
- M. Rüdiger, J. Tittor, K. Gerwert, and D. Oesterhelt. Reconstitution of Bacteriorhodopsin from the Apo-protein and Retinal Studied by Fourier-Transform Infrared Spectroscopy †. *Biochemistry*, 36(16):4867–4874, apr 1997. ISSN 0006-2960. doi: 10.1021/bi962426p. 5.4.5, 5.6.2, 5.7.2
- K. Ruffert, B. Himmel, D. Lall, C. Bamann, E. Bamberg, H. Betz, and V. Eulenburg. Glutamate residue 90 in the predicted transmembrane domain 2 is crucial for cation flux through channelrhodopsin 2. *Biochemical and biophysical research communications*, 410(4):737–43, 2011. ISSN 1090-2104. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.06.024. 1.4.6, 4.2.8, 4.5.2, 5.2.3
- V. A. Ruffin, A. I. Salameh, W. F. Boron, and M. D. Parker. Intracellular pH regulation by acid-base transporters in mammalian neurons. *Frontiers in Physiology*, 5 FEB(February):1–11, 2014. ISSN 1664042X. doi: 10.3389/fphys.2014.00043. 5.8.1
- Q. Sabatier, C. Joffrois, G. Gauvais, J. Chavas, D. Pruneau, S. Picaud, and R. Benosman. Modeling the Electro-chemical Properties of Microbial Opsin ChrimsonR for Application to Optogenetics-based Vision Restoration. *bioRxiv*, page 417899, jan 2018. doi: 10.1101/417899. 5.4.2

- M. Saita, F. Pranga-Sellnau, T. Resler, R. Schlesinger, J. Heberle, and V. A. Lorenz-Fonfria. Photoexcitation of the P₄₈₀ State Induces a Secondary Photocycle That Potentially Desensitizes Channelrhodopsin-2. *Journal of the American Chemical Society*, 140:jacs.8b03931, 2018. ISSN 0002-7863. doi: 10.1021/jacs.8b03931. 5.2, 5.2.2, 4
- L. Salem and P. Bruckmann. Conversion of a photon to an electrical signal by sudden polarisation in the N-retinylidene visual chromophore. *Nature*, 258(5535):526–528, dec 1975. ISSN 0028-0836. doi: 10.1038/258526a0. 1.2
- S. Sankaranarayanan, D. De Angelis, J. E. Rothman, and T. A. Ryan. The Use of pHluorins for Optical Measurements of Presynaptic Activity. *Biophysical Journal*, 79(4):2199–2208, 2000. ISSN 00063495. doi: 10.1016/S0006-3495(00)76468-X. 1.6, 3.4.1
- K. Sato, T. Yamashita, H. Ohuchi, A. Takeuchi, H. Gotoh, K. Ono, M. Mizuno, Y. Mizutani, S. Tomonari, K. Sakai, Y. Imamoto, A. Wada, and Y. Shichida. Opn5L1 is a retinal receptor that behaves as a reverse and self-regenerating photoreceptor. *Nature communications*, 9(1):1255, 2018. ISSN 2041-1723. doi: 10.1038/s41467-018-03603-3. 5.6.2
- T. Sattig, C. Rickert, E. Bamberg, H. J. Steinhoff, and C. Bamann. Light-induced movement of the transmembrane Helix B in Channelrhodopsin-2. *Angewandte Chemie - International Edition*, 52(37):9705–9708, 2013. ISSN 14337851. doi: 10.1002/anie.201301698. 1.4.1, 1.4.4, 5.2.3
- C. Scharnagl, J. Hettenkofer, and S. F. Fischer. Electrostatic and Conformational Effects on the Proton Translocation Steps in Bacteriorhodopsin: Analysis of Multiple M Structures. *The Journal of Physical Chemistry*, 99(19):7787–7800, may 1995. ISSN 0022-3654. doi: 10.1021/j100019a068. 1.3.1
- B. Schätzler, N. A. Dencher, J. Tittor, D. Oesterhelt, S. Yaniv-Checover, E. Nachliel, and M. Gutman. Subsecond Proton-Hole Propagation in Bacteriorhodopsin. *Biophysical Journal*, 84(1):671–686, jan 2003. ISSN 00063495. doi: 10.1016/S0006-3495(03)74887-5. 1.3.1
- U. Scheib, K. Stehfest, C. E. Gee, H. G. Körschen, R. Fudim, T. G. Oertner, and P. Hegemann. The rhodopsin-guanylyl cyclase of the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii* enables fast optical control of cGMP signaling. *Science signaling*, 8(389):rs8, aug 2015. ISSN 1937-9145. doi: 10.1126/scisignal.aab0611. 1.1, 1.6
- P. Scherrer, M. K. Mathew, W. Sperling, and W. Stoerkenius. Retinal isomer ratio in dark-adapted purple membrane and bacteriorhodopsin monomers. *Biochemistry*, 28(2):829–834, jan 1989. ISSN 0006-2960. doi: 10.1021/bi00428a063. 1.3.2, 5.3.4
- J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J.-Y. Tinevez, D. J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak, and A. Cardona. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*, 9(7):676–82, 2012. ISSN 1548-7105. doi: 10.1038/nmeth.2019. 3.6, 3.6.2, ??
- C. Schnedermann, V. Muders, D. Ehrenberg, R. Schlesinger, P. Kukura, and J. Heberle. Vibronic Dynamics of the Ultrafast all-trans to 13-cis Photoisomerization of Retinal in Channelrhodopsin-1. *Journal of the American Chemical Society*, 138(14):4757–62, apr 2016. ISSN 1520-5126. doi: 10.1021/jacs.5b12251. 1.4.2, 6
- F. Schneider. *Design and electrophysiological characterization of rhodopsin-based optogenetic tools*. Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin, 2014. 3.6.1

- F. Schneider, D. Gradmann, and P. Hegemann. Ion selectivity and competition in channelrhodopsins. *Biophysical Journal*, 105(1):91–100, 2013. ISSN 00063495. doi: 10.1016/j.bpj.2013.05.042. 1.4.6, ??, 4.2.3, 5.4.3
- F. Schneider, C. Grimm, and P. Hegemann. Biophysics of Channelrhodopsin. *Annual review of biophysics*, 44:167–186, 2015. ISSN 1936-1238. doi: 10.1146/annurev-biophys-060414-034014. 1.1, 1.2, 1.4.1, 1.4.3, 1.4.6, 2, 3.6.1, 4.5, 5.1.3
- B. Schobert and J. K. Lanyi. Halorhodopsin is a light-driven chloride pump. *Journal of Biological Chemistry*, 257(17):10306–10313, 1982. 1.1
- F. Scholz, E. Bamberg, C. Bamann, and J. Wachtveitl. Tuning the primary reaction of channelrhodopsin-2 by imidazole, pH, and site-specific mutations. *Biophysical journal*, 102(11):2649–57, 2012. ISSN 1542-0086. doi: 10.1016/j.bpj.2012.04.034. 7
- A. K. Sharma, D. A. Walsh, E. Bapteste, F. Rodriguez-Valera, W. Ford Doolittle, and R. T. Papke. Evolution of rhodopsin ion pumps in haloarchaea. *BMC Evolutionary Biology*, 7(1):79, 2007. ISSN 14712148. doi: 10.1186/1471-2148-7-79. 1.3.3
- A. K. Sharma, O. Zhaxybayeva, R. T. Papke, and W. F. Doolittle. Actinorhodopsins: proteorhodopsin-like gene sequences found predominantly in non-marine environments. *Environmental Microbiology*, 10(4): 1039–1056, apr 2008. ISSN 1462-2912. doi: 10.1111/j.1462-2920.2007.01525.x. 1.3.3
- O. A. Shemesh, D. Tanese, V. Zampini, C. Linghu, K. Piatkevich, E. Ronzitti, E. Papagiakoumou, E. S. Boyden, and V. Emiliani. Temporally precise single-cell-resolution optogenetics. *Nature Neuroscience*, 20(12):1796–1806, dec 2017. ISSN 1097-6256. doi: 10.1038/s41593-017-0018-8. 5.8.3
- V. Shevchenko, T. Mager, K. Kovalev, V. Polovinkin, A. Alekseev, J. Juettner, I. Chizhov, C. Bamann, C. Vavourakis, R. Ghai, I. Gushchin, V. Borshchevskiy, A. Rogachev, I. Melnikov, A. Popov, T. Balandin, F. Rodriguez-Valera, D. J. Manstein, G. Bueldt, E. Bamberg, and V. Gordeliy. Inward H⁺ pump xenorhodopsin: Mechanism and alternative optogenetic approach. *Science Advances*, 3(9):e1603187, sep 2017. ISSN 2375-2548. doi: 10.1126/sciadv.1603187. 1.3.3, 1.6, 5.7.3
- M. Sheves, A. Albeck, N. Friedman, and M. Ottolenghi. Controlling the pKa of the bacteriorhodopsin Schiff base by use of artificial retinal analogues. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(10):3262–3266, may 1986. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.83.10.3262. 1.3.1
- K. Shimbo, D. L. Brassard, R. A. Lamb, and L. H. Pinto. Ion selectivity and activation of the M2 ion channel of influenza virus. *Biophysical journal*, 70(3):1335–46, 1996. ISSN 0006-3495. doi: 10.1016/S0006-3495(96)79690-X. 1.4.6
- K. Shimono, M. Iwamoto, M. Sumi, and N. Kamo. Effects of three characteristic amino acid residues of pharaonis phoborhodopsin on the absorption maximum. *Photochemistry and Photobiology*, 72(1):141–5, 2000. ISSN 0031-8655. doi: 10.1562/0031-8655(2000)0720141EOTCAA2.0.CO2. 4.2.5
- J. H. Simpson and L. L. Looger. Functional imaging and optogenetics in drosophila. *Genetics*, 208(4): 1291–1309, 2018. ISSN 19432631. doi: 10.1534/genetics.117.300228. 1.7, 5.8.1
- S. M. Sine, H.-L. Wang, S. Hansen, and P. Taylor. On the Origin of Ion Selectivity in the Cys-Loop Receptor Family. *Journal of Molecular Neuroscience*, 40(1-2):70–76, jan 2010. ISSN 0895-8696. doi: 10.1007/s12031-009-9260-1. 1.4.6

- O. A. Sineshchekov and J. L. Spudich. Sensory Rhodopsin Signaling in Green Flagellate Algae. In *Handbook of Photosensory Receptors*, pages 25–42. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, FRG, sep 2005. ISBN 9783527310197. doi: 10.1002/352760510X.ch2. 1.1
- O. A. Sineshchekov, K.-H. Jung, and J. L. Spudich. Two rhodopsins mediate phototaxis to low- and high-intensity light in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(13):8689–8694, jun 2002. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.122243399. 1.1, 1.4
- O. A. Sineshchekov, V. D. Trivedi, J. Sasaki, and J. L. Spudich. Photochromicity of *Anabaena* sensory rhodopsin, an atypical microbial receptor with a cis-retinal light-adapted form. *The Journal of biological chemistry*, 280(15):14663–8, apr 2005. ISSN 0021-9258. doi: 10.1074/jbc.M501416200. 5.3.3
- O. A. Sineshchekov, E. G. Govorunova, J. Wang, H. Li, and J. L. Spudich. Intramolecular proton transfer in channelrhodopsins. *Biophysical journal*, 104(4):807–17, 2013. ISSN 1542-0086. doi: 10.1016/j.bpj.2013.01.002. 1.4.2, 1.4.3, 5.3.2, 5.4.5
- O. A. Sineshchekov, H. Li, E. G. Govorunova, and J. L. Spudich. Photochemical reaction cycle transitions during anion channelrhodopsin gating. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(14):E1993–2000, apr 2016. ISSN 1091-6490. doi: 10.1073/pnas.1525269113. 5.4.5
- O. A. Sineshchekov, E. G. Govorunova, H. Li, and J. L. Spudich. Bacteriorhodopsin-like channelrhodopsins: Alternative mechanism for control of cation conductance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(45):E9512–E9519, nov 2017. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.1710702114. 1.4, 5.4.4, 5.6.1
- L. Song, M. A. El-Sayed, and J. K. Lanyi. Protein Catalysis of the Retinal Subpicosecond Photoisomerization in the Primary Process of Bacteriorhodopsin Photosynthesis. *Science*, 261(5123):891–894, aug 1993. ISSN 0036-8075. doi: 10.1126/science.261.5123.891. 1.2
- G. Souvignier and K. Gerwert. Proton uptake mechanism of bacteriorhodopsin as determined by time-resolved stroboscopic-FTIR-spectroscopy. *Biophysical Journal*, 63(5):1393–1405, nov 1992. ISSN 00063495. doi: 10.1016/S0006-3495(92)81722-8. 1.3.1
- W. Sperling, P. Carl, C. Rafferty, and N. A. Dencher. Photochemistry and dark equilibrium of retinal isomers and bacteriorhodopsin isomers. *Biophysics of structure and mechanism*, 3(2):79–94, jun 1977. ISSN 0340-1057. doi: 10.1007/BF00535798. 1.3.2, 5.3.3
- D. M. Starace and F. Bezanilla. A proton pore in a potassium channel voltage sensor reveals a focused electric field. *Nature*, 427(6974):548–53, feb 2004. ISSN 1476-4687. doi: 10.1038/nature02270. 5.4.4
- K. Stehfest and P. Hegemann. Evolution of the channelrhodopsin photocycle model. *ChemPhysChem*, 11(6):1120–1126, 2010. ISSN 14394235. doi: 10.1002/cphc.200900980. 1.6, 1.4.5
- K. Stehfest, E. Ritter, A. Berndt, F. Bartl, and P. Hegemann. The branched photocycle of the slow-cycling channelrhodopsin-2 mutant C128T. *Journal of Molecular Biology*, 398(5):690–702, 2010. ISSN 00222836. doi: 10.1016/j.jmb.2010.03.031. 1.4.2, 3, 5.3.5, 5.6.1
- G. Steinberg, M. Sheves, S. Bressler, and M. Ottolenghi. Factors affecting the formation of an M-like intermediate in the photocycle of 13-cis-bacteriorhodopsin. *Biochemistry*, 33(41):12439–12450, oct 1994. ISSN 0006-2960. doi: 10.1021/bi00207a010. 5.4.5

- M. Stierl, P. Stumpf, D. Udvari, R. Gueta, R. Hagedorn, A. Losi, W. G??rtner, L. Petereit, M. Efetova, M. Schwarzel, T. G. Oertner, G. Nagel, and P. Hegemann. Light modulation of cellular cAMP by a small bacterial photoactivated adenylyl cyclase, bPAC, of the soil bacterium *Beggiatoa*. *Journal of Biological Chemistry*, 286(2):1181–1188, 2011. ISSN 00219258. doi: 10.1074/jbc.M110.185496. 1.6
- S. Subramaniam, T. Marti, and H. G. Khorana. Protonation state of Asp (Glu)-85 regulates the purple-to-blue transition in bacteriorhodopsin mutants Arg-82 -* Ala and Asp-85 –Glu: The blue form is inactive in proton translocation. *Biophysics*, 87(February):1013–1017, 1990. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.87.3.1013. 1.3.1, 1.3.2, 4.2.6, 5.3.1, 5.9
- Y. Sudo and S. Yoshizawa. Functional and Photochemical Characterization of a Light-Driven Proton Pump from the Gammaproteobacterium *Pantoea vagans*. *Photochemistry and Photobiology*, 92(3):420–427, may 2016. ISSN 00318655. doi: 10.1111/php.12585. 1.3.3
- Y. Sudo, A. Okazaki, H. Ono, J. Yagasaki, S. Sugo, M. Kamiya, L. Reissig, K. Inoue, K. Ihara, H. Kandori, S. Takagi, and S. Hayashi. A blue-shifted light-driven proton pump for neural silencing. *Journal of Biological Chemistry*, 288(28):20624–20632, 2013. ISSN 00219258. doi: 10.1074/jbc.M113.475533. 4.2.5, 5.1.3, 5.8.3
- Y. Sugiyama, H. Wang, T. Hikima, M. Sato, J. Kuroda, T. Takahashi, T. Ishizuka, and H. Yawo. Photocurrent attenuation by a single polar-to-nonpolar point mutation of channelrhodopsin-2. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*, 8(3):328–336, 2009. ISSN 1474-905X. doi: 10.1039/b815762f. 1.4.6, 4.2.8, 4.3, 5.1.2, 5.2.3, 5.6, 5.6.1
- I. Szundi and W. Stoeckenius. Purple-to-blue transition of bacteriorhodopsin in a neutral lipid environment. *Biophysical Journal*, 54(2):227–232, aug 1988. ISSN 00063495. doi: 10.1016/S0006-3495(88)82951-5. 5.3.1
- I. Szundi, H. Li, E. Chen, R. Bogomolni, J. L. Spudich, and D. S. Kliger. *Platymonas subcordiformis* Channelrhodopsin-2 Function: I. THE PHOTOCHEMICAL REACTION CYCLE. *The Journal of biological chemistry*, 290(27):16573–84, jul 2015. ISSN 1083-351X. doi: 10.1074/jbc.M114.631614. 1.4.2
- A. L. Szymczak-Workman, K. M. Vignali, and D. A. A. Vignali. Design and construction of 2A peptide-linked multicistronic vectors. *Cold Spring Harbor protocols*, 2012(2):199–204, feb 2012. ISSN 1559-6095. doi: 10.1101/pdb.ip067876. ??, 4.6.2
- M. Takemoto, H. E. Kato, M. Koyama, J. Ito, M. Kamiya, S. Hayashi, A. D. Maturana, K. Deisseroth, R. Ishitani, and O. Nureki. Molecular Dynamics of Channelrhodopsin at the Early Stages of Channel Opening. *Plos One*, 10(6):e0131094, 2015. ISSN 1932-6203. doi: 10.1371/journal.pone.0131094. 1.4.1, 1.4.4, 5.5
- R. Tanaka, T. Higuchi, S. Kohatsu, K. Sato, and D. Yamamoto. Optogenetic Activation of the fruitless -Labeled Circuitry in *Drosophila subobscura* Males Induces Mating Motor Acts. *The Journal of Neuroscience*, 37(48):11662–11674, nov 2017. ISSN 0270-6474. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1943-17.2017. 5.8.1
- S. Tang and J. J. Yang. Magnesium Binding Sites in Proteins. In R. H. Kretsinger, V. N. Uversky, and E. A. Permyakov, editors, *Encyclopedia of Metalloproteins*, pages 1243–1250. Springer New York, New York, NY, 2013. ISBN 978-1-4614-1533-6. doi: 10.1007/978-1-4614-1533-6_257. 5.4.3

- S. Tanimoto, Y. Sugiyama, T. Takahashi, T. Ishizuka, and H. Yawo. Involvement of glutamate 97 in ion influx through photo-activated channelrhodopsin-2. *Neuroscience Research*, 75(1):13–22, 2013. ISSN 01680102. doi: 10.1016/j.neures.2012.05.008. 1.4.6
- A. R. Taylor, C. Brownlee, and G. L. Wheeler. Proton channels in algae: Reasons to be excited. *Trends in Plant Science*, 17(11):675–684, 2012. ISSN 13601385. doi: 10.1016/j.tplants.2012.06.009. 1.1
- J. A. Thomas, R. N. Buchsbaum, A. Zimniak, and E. Racker. Intracellular pH Measurements in Ehrlich Ascites Tumor Cells Utilizing Spectroscopic Probes Generated in Situ. *Biochemistry*, 18(11):2210–2218, 1979. ISSN 15204995. doi: 10.1021/bi00578a012. 3.4.2
- P. Thomas and T. G. Smart. HEK293 cell line: A vehicle for the expression of recombinant proteins. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 51(3 SPEC. ISS.):187–200, 2005. ISSN 10568719. doi: 10.1016/j.vascn.2004.08.014. 7
- J. L. Thomaston, R. A. Woldeyes, T. Nakane, A. Yamashita, T. Tanaka, K. Koiwai, A. S. Brewster, B. A. Barad, Y. Chen, T. Lemmin, M. Uervirojnangkoorn, T. Arima, J. Kobayashi, T. Masuda, M. Suzuki, M. Sugahara, N. K. Sauter, R. Tanaka, O. Nureki, K. Tono, Y. Joti, E. Nango, S. Iwata, F. Yumoto, J. S. Fraser, and W. F. DeGrado. XFEL structures of the influenza M2 proton channel: Room temperature water networks and insights into proton conduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(51):13357–13362, dec 2017. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.1705624114. 1.5
- Y. Tian, S. Gao, E. L. von der Heyde, A. Hallmann, and G. Nagel. Two-component cyclase opsins of green algae are ATP-dependent and light-inhibited guanylyl cyclases. *BMC Biology*, 16(1):144, dec 2018. ISSN 1741-7007. doi: 10.1186/s12915-018-0613-5. 1.1
- T. Tillman, M. Cheng, Q. Chen, P. Tang, and Y. Xu. Reversal of ion charge selectivity renders the pentameric ligand-gated ion channel GLIC insensitive to anesthetics. *Biochemical Journal*, 68:61–68, 2012. ISSN 0264-6021. doi: 10.1042/BJ20121072. 1.4.6, ??, 4.6.3, 4.29
- J. Tittor, C. Soell, D. Oesterhelt, H. J. Butt, and E. Bamberg. A defective proton pump, point-mutated bacteriorhodopsin Asp96—Asn is fully reactivated by azide. *The EMBO journal*, 8(11):3477–82, nov 1989. ISSN 0261-4189. doi: 10.1002/j.1460-2075.1989.tb08512.x. 5.6.1
- J. Tittor, U. Schweiger, D. Oesterhelt, and E. Bamberg. Inversion of proton translocation in bacteriorhodopsin mutants D85N, D85T, and D85,96N. *Biophysical Journal*, 67(4):1682–1690, oct 1994. ISSN 00063495. doi: 10.1016/S0006-3495(94)80642-3. 1.3.4
- T. Tkatch, E. Greotti, G. Baranauskas, D. Pendin, S. Roy, L. I. Nita, J. Wettmarshausen, M. Prigge, O. Yizhar, O. S. Shirihai, D. Fishman, M. Hershfinkel, I. A. Fleidervish, F. Perocchi, T. Pozzan, and I. Sekler. Optogenetic control of mitochondrial metabolism and Ca²⁺ signaling by mitochondria-targeted opsins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, page 201703623, jun 2017. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.1703623114. 5.8.1
- F. Tombola, M. M. Pathak, and E. Y. Isacoff. Voltage-sensing arginines in a potassium channel permeate and occlude cation-selective pores. *Neuron*, 45(3):379–88, feb 2005. ISSN 0896-6273. doi: 10.1016/j.neuron.2004.12.047. 5.4.3, 5.4.4
- F. Tombola, M. H. Ulbrich, and E. Y. Isacoff. The voltage-gated proton channel Hv1 has two pores, each controlled by one voltage sensor. *Neuron*, 58(4):546–56, may 2008. ISSN 1097-4199. doi: 10.1016/j.neuron.2008.03.026. 5.4.3

- R. Y. Tsien. A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells, 1981. ISSN 00280836. 3.4.1
- S. P. Tsunoda and P. Hegemann. Glu 87 of channelrhodopsin-1 causes pH-dependent color tuning and fast photocurrent inactivation. *Photochemistry and Photobiology*, 85(2):564–569, 2009. ISSN 00318655. doi: 10.1111/j.1751-1097.2008.00519.x. 5.1.2
- S. P. Tsunoda, D. Ewers, S. Gazzarrini, A. Moroni, D. Gradmann, and P. Hegemann. H⁺-pumping rhodopsin from the marine alga *Acetabularia*. *Biophysical journal*, 91(4):1471–9, 2006. ISSN 0006-3495. doi: 10.1529/biophysj.106.086421. 1.3.3
- Y.-H. Tu, A. J. Cooper, B. Teng, R. B. Chang, D. J. Artiga, H. N. Turner, E. M. Mulhall, W. Ye, A. D. Smith, and E. R. Liman. An evolutionarily conserved gene family encodes proton-selective ion channels. *Science (New York, N.Y.)*, 359(6379):1047–1050, 2018. ISSN 1095-9203. doi: 10.1126/science.aao3264. 5.4.5
- D. Urmann, C. Lorenz, S. M. Linker, M. Braun, J. Wachtveitl, and C. Bamann. Photochemical Properties of the Red-shifted Channelrhodopsin Chrimson. *Photochemistry and Photobiology*, 93(3):782–795, 2017. ISSN 00318655. doi: 10.1111/php.12741. 5.1.1, 5.1.3, 5.1.4, 5.3.1, 5.3.3, 5.4.1, 5.6.1
- G. Váró and J. Lanyi. Photoreactions of bacteriorhodopsin at acid pH. *Biophysical Journal*, 56(6):1143–1151, dec 1989. ISSN 00063495. doi: 10.1016/S0006-3495(89)82761-4. 5.3.2
- P. Venkataraman, R. A. Lamb, and L. H. Pinto. Chemical rescue of histidine selectivity filter mutants of the M2 ion channel of influenza A virus. *Journal of Biological Chemistry*, 280(22):21463–21472, 2005. ISSN 00219258. doi: 10.1074/jbc.M412406200. 1.5
- M. K. Verhoefen, C. Bamann, R. Blöcher, U. Förster, E. Bamberg, and J. Wachtveitl. The photocycle of channelrhodopsin-2: Ultrafast reaction dynamics and subsequent reaction steps. *ChemPhysChem*, 11(14):3113–3122, 2010. ISSN 14394235. doi: 10.1002/cphc.201000181. 1.4.2, 5.2.1
- J. Vierock, C. Grimm, N. Nitzan, and P. Hegemann. Molecular determinants of proton selectivity and gating in the red-light activated channelrhodopsin Chrimson. *Scientific Reports*, 7(1):1–15, 2017. ISSN 20452322. doi: 10.1038/s41598-017-09600-8. 1.1, ??, ??, 5.1.1, 5.1.3, 5.1.4
- L. Vogeley, O. A. Sineshchekov, V. D. Trivedi, J. Sasaki, J. L. Spudich, and H. Luecke. Anabaena sensory rhodopsin: a photochromic color sensor at 2.0 Å. *Science (New York, N.Y.)*, 306(5700):1390–3, nov 2004. ISSN 1095-9203. doi: 10.1126/science.1103943. 1, 5.3.3
- A. Vogt. *Elektrophysiologische Untersuchung des gerichteten Protonentransportes in mikrobiellen Rhodopsinen*. Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin, 2017. 5.7
- A. Vogt, J. Wietek, and P. Hegemann. Gloeobacter rhodopsin, limitation of proton pumping at high electrochemical load. *Biophysical Journal*, 105(9):2055–2063, 2013. ISSN 00063495. doi: 10.1016/j.bpj.2013.08.031. 1.1, 1.3.4
- A. Vogt, Y. Guo, S. P. Tsunoda, S. Kateriya, M. Elstner, and P. Hegemann. Conversion of a light-driven proton pump into a light-gated ion channel. *Scientific Reports*, 5:16450, 2015. ISSN 2045-2322. doi: 10.1038/srep16450. 1.3.4, 5, ??, ??, 4.6.2, 5.6.1, 5.7.1

- O. Volkov, K. Kovalev, V. Polovinkin, V. Borshchevskiy, C. Bamann, R. Astashkin, E. Marin, A. Popov, T. Balandin, D. Willbold, G. Büldt, E. Bamberg, and V. Gordeliy. Structural insights into ion conduction by channelrhodopsin 2. *Science*, 358(6366):eaan8862, 2017. ISSN 0036-8075. doi: 10.1126/science.aan8862. 1.4.1, 1.4.3, 4.5.2, 4.24, 4.25, 5.1, 5.1.4, 5.3.4, 5.6, 5.6.1, 5.6.2, 5.7.2, A.7
- P. Volz, N. Krause, J. Balke, C. Schneider, M. Walter, F. Schneider, R. Schlesinger, and U. Alexiev. Light and pH-induced Changes in Structure and Accessibility of Transmembrane Helix B and Its Immediate Environment in Channelrhodopsin-2. *Journal of Biological Chemistry*, 291(33):17382–17393, aug 2016. ISSN 0021-9258. doi: 10.1074/jbc.M115.711200. 1.4.4, 5.5
- R. Waldmann, G. Champigny, F. Bassilana, C. Heurteaux, and M. Lazdunski. A proton-gated cation channel involved in acid-sensing, 1997. ISSN 00280836. 4.6.3
- C. Wang, R. A. Lamb, and L. H. Pinto. Activation of the M2 ion channel of influenza virus: a role for the transmembrane domain histidine residue. *Biophysical journal*, 69(4):1363–71, 1995. ISSN 0006-3495. doi: 10.1016/S0006-3495(95)80003-2. 1.5
- T. Wang, A. O. Sessions, C. S. Lunde, S. Rouhani, R. M. Glaeser, Y. Duan, and M. T. Facciotti. Deprotonation of D96 in Bacteriorhodopsin Opens the Proton Uptake Pathway. *Structure*, 21(2):290–297, feb 2013. ISSN 09692126. doi: 10.1016/j.str.2012.12.018. 1.3.1
- W. Wang, Z. Nossoni, T. Berbasova, C. T. Watson, I. Yapici, K. S. S. Lee, C. Vasileiou, J. H. Geiger, and B. Borhan. Tuning the electronic absorption of protein-embedded all-trans-retinal. *Science (New York, N.Y.)*, 338(6112):1340–3, dec 2012. ISSN 1095-9203. doi: 10.1126/science.1226135. 1.2
- W. Wang, J. H. Geiger, and B. Borhan. The photochemical determinants of color vision: revealing how opsins tune their chromophore’s absorption wavelength. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 36(1):65–74, jan 2014. ISSN 1521-1878. doi: 10.1002/bies.201300094. 1.2
- H. C. Watanabe, K. Welke, F. Schneider, S. Tsunoda, F. Zhang, K. Deisseroth, P. Hegemann, and M. Elstner. Structural model of channelrhodopsin. *Journal of Biological Chemistry*, 287(10):7456–7466, mar 2012. ISSN 00219258. doi: 10.1074/jbc.M111.320309. 5.1.2
- H. C. Watanabe, K. Welke, D. J. Sindhikara, P. Hegemann, and M. Elstner. Towards an understanding of channelrhodopsin function: simulations lead to novel insights of the channel mechanism. *Journal of molecular biology*, 425(10):1795–814, 2013. ISSN 1089-8638. doi: 10.1016/j.jmb.2013.01.033. 1.4.1, 1.4.6, 5.1.4
- S. Watanabe, T. Ishizuka, S. Hososhima, A. Zamani, M. R. Hoque, and H. Yawo. The regulatory mechanism of ion permeation through a channelrhodopsin derived from *Mesostigma viride* (MvChR1). *Photochemical & Photobiological Sciences*, 15(3):365–374, 2016. ISSN 1474-905X. doi: 10.1039/C5PP00290G. 1.4.6
- A. Waterhouse, M. Bertoni, S. Bienert, G. Studer, G. Tauriello, R. Gumienny, F. T. Heer, T. A. P. de Beer, C. Rempfer, L. Bordoli, R. Lepore, and T. Schwede. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*, 46(W1):W296–W303, jul 2018. ISSN 0305-1048. doi: 10.1093/nar/gky427. 4.20
- S. A. Weinman and L. M. Maglova. Free concentrations of intracellular fluorescent anions determined by cytoplasmic dialysis of isolated hepatocytes. *Am J Physiol*, 267(5 Pt 1):G922–31, 1994. ISSN 01931857. 5.4.2

- R. Weissleder. A clearer vision for in vivo imaging. *Nature biotechnology*, 19(4):316–7, apr 2001. ISSN 1087-0156. doi: 10.1038/86684. 1.7
- J. Wietek. *Anionen leitende Kanalrhodopsine*. Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin, 2018. 3.3.2, 3.10, 3.6.1, 5.1.3
- J. Wietek and M. Prigge. Enhancing Channelrhodopsins: An Overview. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1408:141–65, 2016. ISSN 1940-6029. doi: 10.1007/978-1-4939-3512-3_10. 1.7
- J. Wietek, J. S. Wiegert, N. Adeishvili, F. Schneider, H. Watanabe, S. P. Tsunoda, A. Vogt, M. Elstner, T. G. Oertner, and P. Hegemann. Conversion of channelrhodopsin into a light-gated chloride channel. *Science (New York, N.Y.)*, 344(6182):409–12, 2014. ISSN 1095-9203. doi: 10.1126/science.1249375. 1.4.6, 1.6, 4.6.3, 5.4.4, 5.4.5
- J. Wietek, R. Beltramo, M. Scanziani, P. Hegemann, T. G. Oertner, and J. S. Wiegert. An improved chloride-conducting channelrhodopsin for light-induced inhibition of neuronal activity in vivo. *Scientific Reports*, 5(1):14807, dec 2015. ISSN 2045-2322. doi: 10.1038/srep14807. 1.6, 5.4.4
- J. Wietek, M. Broser, B. S. Krause, and P. Hegemann. Identification of a Natural Green Light Absorbing Chloride Conducting Channelrhodopsin from *Proteomonas sulcata*. *Journal of Biological Chemistry*, 291(8):4121–4127, feb 2016. ISSN 0021-9258. doi: 10.1074/jbc.M115.699637. 1.1, 1.4, ??, ??, 5.4.5
- J. Wietek, S. Rodriguez-Rozada, J. Tutas, F. Tenedini, C. Grimm, T. G. Oertner, P. Soba, P. Hegemann, and J. Simon Wiegert. Anion-conducting channelrhodopsins with tuned spectra and modified kinetics engineered for optogenetic manipulation of behavior. *Scientific Reports*, 7(1):1–18, 2017. ISSN 20452322. doi: 10.1038/s41598-017-14330-y. ??, ??, 4.6.1, 5.1.3
- C. A. Wraight. Chance and design—proton transfer in water, channels and bioenergetic proteins. *Biochimica et biophysica acta*, 1757(8):886–912, aug 2006. ISSN 0006-3002. doi: 10.1016/j.bbabi.2006.06.017. 1.5
- Y. Wu, B. Ilan, and G. A. Voth. Charge Delocalization in Proton Channels, II: The Synthetic LS2 Channel and Proton Selectivity. *Biophysical Journal*, 92(1):61–69, jan 2007. ISSN 00063495. doi: 10.1529/biophysj.106.091942. 1.5
- Y. Xu, P. Zou, and A. E. Cohen. Voltage imaging with genetically encoded indicators. *Current opinion in chemical biology*, 39:1–10, aug 2017. ISSN 1879-0402. doi: 10.1016/j.cbpa.2017.04.005. 1.6
- Y. Yamauchi, M. Konno, S. Ito, S. P. Tsunoda, K. Inoue, and H. Kandori. Molecular properties of a DTD channelrhodopsin from *Guillardia theta*. *Biophysics and Physicobiology*, 14:57–66, 2017. ISSN 2189-4779. doi: 10.2142/biophysico.14.0_57. 1.1, 1.4
- V. J. Yao and J. L. Spudich. Primary structure of an archaeobacterial transducer, a methyl-accepting protein associated with sensory rhodopsin I. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(24):11915–11919, dec 1992. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.89.24.11915. 1.1
- O. Yizhar, L. E. Fenno, M. Prigge, F. Schneider, T. J. Davidson, D. J. O’Shea, V. S. Sohal, I. Goshen, J. Finkelstein, J. T. Paz, K. Stehfest, R. Fudim, C. Ramakrishnan, J. R. Huguenard, P. Hegemann, and K. Deisseroth. Neocortical excitation/inhibition balance in information processing and social dysfunction. *Nature*, 477(7363):171–178, sep 2011. ISSN 0028-0836. doi: 10.1038/nature10360. 1.7, ??, 5.1.1

- K. Yoshida, S. P. Tsunoda, L. S. Brown, and H. Kandori. A unique choanoflagellate enzyme rhodopsin exhibits light-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase activity. *Journal of Biological Chemistry*, 292(18):7531–7541, may 2017. ISSN 0021-9258. doi: 10.1074/jbc.M117.775569. 1.1
- M. Zaniboni, P. Swietach, A. Rossini, T. Yamamoto, K. W. Spitzer, and R. D. Vaughan-Jones. Intracellular proton mobility and buffering power in cardiac ventricular myocytes from rat, rabbit, and guinea pig. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 285(3):H1236–46, 2003. ISSN 0363-6135. doi: 10.1152/ajpheart.00277.2003. 5.4.2
- W.-Z. Zeng, D.-S. Liu, L. Liu, L. She, L.-J. Wu, and T.-L. Xu. Activation of acid-sensing ion channels by localized proton transient reveals their role in proton signaling. *Scientific reports*, 5(August):14125, 2015. ISSN 2045-2322. doi: 10.1038/srep14125. 5.8.4
- F. Zhang, L.-P. Wang, M. Brauner, J. F. Liewald, K. Kay, N. Watzke, P. G. Wood, E. Bamberg, G. Nagel, A. Gottschalk, and K. Deisseroth. Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry. *Nature*, 446(7136):633–9, apr 2007. ISSN 1476-4687. doi: 10.1038/nature05744. 1.6
- F. Zhang, M. Prigge, F. Beyrière, S. P. Tsunoda, J. Mattis, O. Yizhar, P. Hegemann, and K. Deisseroth. Red-shifted optogenetic excitation: a tool for fast neural control derived from *Volvox carteri*. *Nature Neuroscience*, 11(6):631–633, jun 2008. ISSN 1097-6256. doi: 10.1038/nn.2120. 1.4, 1.7
- F. Zhang, J. Vierock, O. Yizhar, L. E. Fenno, S. Tsunoda, A. Kianianmomeni, M. Prigge, A. Berndt, J. Cushman, J. Polle, J. Magnuson, P. Hegemann, and K. Deisseroth. The microbial opsin family of optogenetic tools. *Cell*, 147(7):1446–57, 2011. ISSN 1097-4172. doi: 10.1016/j.cell.2011.12.004. 1.1, 1.1, 1.3.4, 5, 1.4, 1.4.3, 1.4.6, 1.6, 2, ??, 5, 5.4
- P. Zhang and C. M. Canessa. Single Channel Properties of Rat Acid-sensitive Ion Channel-1 α , -2a, and -3 Expressed in *Xenopus* Oocytes. *The Journal of General Physiology*, 120(4):553–566, oct 2002. ISSN 0022-1295. doi: 10.1085/jgp.20028574. 4.6.3, 5.8.4
- C. Zscherp, R. Schlesinger, J. Tittor, D. Oesterhelt, and J. Heberle. In situ determination of transient pKa changes of internal amino acids of bacteriorhodopsin by using time-resolved attenuated total reflection Fourier-transform infrared spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(10):5498–503, may 1999. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.96.10.5498. 1.3.1, 5.1.2
- C. Zscherp, R. Schlesinger, and J. Heberle. Time-resolved FT-IR spectroscopic investigation of the pH-dependent proton transfer reactions in the E194Q mutant of bacteriorhodopsin. *Biochemical and biophysical research communications*, 283(1):57–63, apr 2001. ISSN 0006-291X. doi: 10.1006/bbrc.2001.4730. 1.3.1
- M. Zuker, D. H. Mathews, and D. H. Turner. Algorithms and Thermodynamics for RNA Secondary Structure Prediction: A Practical Guide. In *RNA Biochemistry and Biotechnology*, pages 11–43. Springer Netherlands, Dordrecht, 1999. doi: 10.1007/978-94-011-4485-8_2. 1

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1.1:	Funktionen mikrobieller Rhodopsine	14
Abbildung 1.2:	Lichtabsorption mikrobieller Rhodopsine	16
Abbildung 1.3:	Photozyklus der Protonenpumpe Bacteriorhodopsin	18
Abbildung 1.4:	Struktur der Kanalrhodopsinchimäre C1C2	26
Abbildung 1.5:	Kanalrhodopsinphotozyklus von C1C2 und <i>CrChR2</i>	28
Abbildung 1.6:	Lichtadaptation des Kanalrhodopsinphotostroms	32
Abbildung 1.7:	Verschiedene Kanalrhodopsine aus Chlorophyten Algen	39
Abbildung 3.1:	Intrazelluläre BCECF-Kalibrierung	60
Abbildung 3.2:	Kalibrierung des membrangebundenen pHluorinSE	61
Abbildung 4.1:	Protonenselektivität verschiedener ChRs	70
Abbildung 4.2:	Intrazelluläre pH-Wert-Änderungen und Photostromrückgang in Chrimson	72
Abbildung 4.3:	Abhängigkeit des Photostromrückgangs von der intrazellulären Pufferkonzentration	73
Abbildung 4.4:	Erholung des Photostroms von Chrimson	73
Abbildung 4.5:	Vergleich der intrazellulären pH-Wert-Änderung von ChRs verschiedener Protonenselektivität	75
Abbildung 4.6:	Chrimsonvarianten verschiedener N-Termini	77
Abbildung 4.7:	pH-Abhängigkeit des Chrimsonphotostroms	78
Abbildung 4.8:	Ionenselektivität von Chrimson	80
Abbildung 4.9:	H ⁺ -Na ⁺ -Kompetition und Kalziumleitfähigkeit von Chrimson	82
Abbildung 4.10:	Chrimson-Mutanten der Retinalbindetasche	84
Abbildung 4.11:	Chrimson-Mutanten des Gegenionkomplexes	86
Abbildung 4.12:	Chrimson-Mutanten der Pore	88
Abbildung 4.13:	Einfluss von Helix-2-Glutaminsäuremutanten auf die Protonenselektivität von Chrimson	91
Abbildung 4.14:	Kinetik und Aktionsspektrum von Helix2-Glutaminsäuremutanten von Chrimson	92
Abbildung 4.15:	Molekulare Bestimmungsfaktoren der Protonenselektivität von Chrimson	93
Abbildung 4.16:	Zeitliche Entwicklung des Chrimsonphotostroms	95
Abbildung 4.17:	Lichtadaptation von Chrimson	97
Abbildung 4.18:	UV-sensitiver Dunkelstrom von Chrimson	99

Abbildung 4.19:	Zeitliche Entwicklung des Photostroms und einwärtsgerichteter Protonentransport von Chrimson-E4 ¹ -Mutanten	100
Abbildung 4.20:	Molekulare Bestimmungsfaktoren der Protonenleitung von CsChR	102
Abbildung 4.21:	Protonentransport in CsR und CsR Y14E	104
Abbildung 4.22:	Inaktivierung von CrChR2 durch 7ns-Laserblitze	106
Abbildung 4.23:	Zeitliche Entwicklung der Ionenselektivität von CrChR2	107
Abbildung 4.24:	Zeitliche Entwicklung der Ionenselektivität von CrChR2 E90Q vor und nach Lichtadaptation	110
Abbildung 4.25:	Photoströme von CrChR2 T159M und CrChR2 D156C T159M in HEK293-Zellen	111
Abbildung 4.26:	Ionenselektivität von CrChR2 T159M und D156C T159M	112
Abbildung 4.27:	Kanalrhodopsinfusionskonstrukte	114
Abbildung 4.28:	Lokale pH-Wert-Messungen an der Zelloberfläche	118
Abbildung 4.29:	Protonengekoppelte Zwei-Komponenten-Optogenetik	120
Abbildung 4.30:	pH- und Lichtaktivierung der Zwei-Komponenten-Systeme	121
Abbildung 4.31:	Zwei-Komponenten-Konstrukte bei verschiedener Pufferkapazität und Lichtintensität	122
Abbildung 4.32:	Lichtaktivierung eines Zwei-Komponenten-Systems mit und ohne extrazellulären Lösungsaustausch	123
Abbildung 4.33:	Photostromerholung nach Lichtaktivierung von Asic2a	124
Abbildung 5.1:	Molekulare Bestimmungsfaktoren der Farbabsorption verschiedener ChRs	128
Abbildung 5.2:	Photozyklus von CrChR2	135
Abbildung 5.3:	Photozyklusmodell von Chrimson	140
Abbildung 5.4:	Molekulare Bestimmungsfaktoren der Protonenselektivität	152
Abbildung 5.5:	Mögliche Ionentransportwege verschiedener ChRs	156
Abbildung 5.6:	Strukturbiologischer Vergleich des inneren Tores, zentralen Tores und der äußeren Pore verschiedener ChRs	158
Abbildung 5.7:	Optogenetische Werkzeuge	168
Abbildung A.1:	Protonenselektivität N-terminal modifizierter Chrimsonvarianten	175
Abbildung A.2:	Guanidiniumleitfähigkeit von CrChR2 und Chrimson	176
Abbildung A.3:	Guanidiniumleitfähigkeit von Chrimson R162H	176
Abbildung A.4:	Photoströme von Chrimson und ReaChR bei asymmetrischer Cl ⁻ Konzentration und unterschiedlicher Belichtung	177
Abbildung A.5:	Aminosäuresequenzvergleich verschiedener ChRs	178
Abbildung A.5:	Aminosäuresequenzvergleich verschiedener ChRs (Fortsetzung)	179

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 3.1:	Verwendete Gene	44
Tabelle 3.2:	Verwendete Plasmide	44
Tabelle 3.3:	Puffer- und Nährlösung zur Vermehrung und Modifikation der Expressionsplasmide	44
Tabelle 3.4:	Reaktionsansätze für die ortsgerichtete Mutagenese, DNA-Klonierung, Linearisierung und in vitro Transkription	46
Tabelle 3.5:	PCR-Protokoll	46
Tabelle 3.6:	Zusammensetzung der Puffer und Medien für die heterologe Proteinexpression	48
Tabelle 3.7:	Zusammensetzung der extrazellulären Puffer für TEVC-Messungen in Oozyten	52
Tabelle 3.8:	Zusammensetzung der extrazellulären Messpuffer für „Whole-cell-patch-clamp“-Messungen an HEK293-Zellen	53
Tabelle 3.9:	Zusammensetzung der intrazellulären Pipettenlösungen für „Whole-cell-patch-clamp“-Messungen an HEK293-Zellen	54
Tabelle 3.10:	Wichtige Einzelkomponenten der elektrophysiologischen Messapparaturen	55
Tabelle 3.11:	Lichtintensitäten der elektrophysiologischen und bildgebenden Experimente	56
Tabelle 3.12:	Zusammensetzung der Puffer für die Proteinaufreinigung und Spektroskopie	63
Tabelle 3.13:	Berücksichtigte Diffusionspotentiale	66
Tabelle A.1:	Relative Protonenpermeabilität verschiedener Kanalrhodopsine	180
Tabelle A.2:	Photostromdichte, Aktivierungswellenlänge und Kinetik von Chrimson Varianten	180
Tabelle A.3:	Photostromdichte, Aktivierungswellenlänge und Kinetiken von Chrimson Mutante	181
Tabelle A.3:	Photostromdichte, Aktivierungswellenlänge und Kinetiken von Chrimson Mutanten (Fortsetzung)	182
Tabelle A.4:	Protonenselektivität von Chrimsonmutanten	183
Tabelle A.4:	Protonenselektivität von Chrimsonmutanten (Fortsetzung)	184
Tabelle A.5:	Photostromdichte, Aktivierungswellenlänge und Kinetiken von <i>CsChR1</i> Mutanten	184
Tabelle A.6:	Photostromkinetiken von <i>CrChR2</i> bei $\text{pH}_{i,e}7,2$	185
Tabelle A.7:	pK_a -Werte ausgewählter Seitengruppen in C1Chrimson, C1C2 und <i>CrChR2</i>	185

Tabelle A.8:	Für die Molekularbiologie und Vorbereitung elektrophysiologischer Experimente verwendete Geräte	186
Tabelle A.9:	Für die Proteinexpression und Aufreinigung verwendete Geräte und Materialien	186
Tabelle A.10:	Für die biophysikalische Messungen verwendete Geräte	187
Tabelle A.11:	Verwendete Computerprogramme	188
Tabelle A.12:	Für die Molekularbiologie verwendete Substanzen und Chemikalien	189
Tabelle A.13:	Für die Proteinexpression verwendete Substanzen und Chemikalien	189
Tabelle A.14:	Verwendete Zellen, Stämme und Frösche	190
Tabelle A.15:	Für bildgebende Verfahren genutzte Substanzen	190
Tabelle A.16:	Verbrauchsmaterialien elektrophysiologischer Experimente	190

EIGENSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit erstmalig einzureichen und eigenständig verfasst zu haben und versichere, dass keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet wurden.

Berlin, den

(Johannes Vierock)