

**LICHT  
EIN**

**LICHT  
AUS**

LICHT EIN, LICHT AUS

# DER MOLEKULARE SCHALTER

BARBARA DI VENTURA & ROLAND EILS

**Ein neuer Forschungsbereich, die „Optogenetik“, macht es möglich, das Verhalten von Zellen per Licht zu steuern. Heidelberger Wissenschaftler haben ein spezielles optogenetisches Verfahren entwickelt, mit dem sie Proteine gezielt im Innern von Zellen dirigieren können. Das eröffnet vielfältige Anwendungsmöglichkeiten sowohl in der Grundlagen- wie in der angewandten Forschung.**

# D

Die „synthetische Biologie“ ist eine noch junge Disziplin. Sie hat es sich zum Ziel gesetzt, Zellen mit neuen, in der Natur nicht vorkommenden Eigenschaften auszustatten. Neben den klassischen Ansätzen der Naturwissenschaft werden dazu auch ingenieurwissenschaftliche Prinzipien angewendet: Wie Maschinenbauer nutzen synthetische Biologen standardisierte biologische Bausteine, um sie zu komplexen Schaltkreisen zuzusammenfügen und in Zellen einzubauen, wo sie neue Funktionen übernehmen sollen. Die synthetische Biologie dient nicht allein dem Erkenntnisgewinn der Grundlagenforscher – sie bietet auch ein großes Anwendungspotenzial, etwa in der Medizin oder in der Umwelt- und Biotechnologie. Neue biologische Systeme können es beispielsweise möglich machen, Impfstoffe und Medikamente schneller zu entwickeln, chemische Grundstoffe kostengünstiger zu produzieren oder nicht fossile Brennstoffe zu erzeugen.

## Optogenetik – ein Werkzeug der synthetischen Biologie

Ein Teilbereich der synthetischen Biologie, mit dem sich unsere Abteilung an der Universität Heidelberg intensiv beschäftigt, ist die Optogenetik. Dabei handelt es sich um eine neue Technik, die optische und genetische Methoden kombiniert, um Zellen gezielt zu beeinflussen. Das Feld der Optogenetik entwickelt sich zurzeit rapide, weil Licht ein ideales und vergleichsweise einfaches Mittel ist, um biologische Prozesse zu steuern: Im Unterschied zu chemischen Signalen kann Licht sehr präzise angewendet werden, es lässt sich zudem einfach wieder ausschalten oder neu verabreichen. Als „Lichtschalter“ nutzen Optogenetiker Proteine, die in der Natur vorkommen und die empfindlich auf Photonen reagieren.

Ursprünglich wurde die Optogenetik mit dem Ziel entwickelt, die Funktionen einzelner Neuronen im Gehirn zu verstehen. Als bahnbrechend gilt eine vor wenigen Jahren veröffentlichte Arbeit der amerikanischen Neurowissenschaftler Edward Boyden und Karl Deisseroth. Zusammen mit ihren Mitarbeitern war es den beiden Wissenschaftlern gelungen, neuronale Signale in definierten Nervenzellpopulationen mit kurzen Pulsen blauen Lichts auszulösen (Photostimulation). Dazu nutzten sie ein lichtempfindliches Protein, das einen Ionenkanal formt und „Channelrhodopsin 2“, kurz ChR2, genannt wird. ChR2 reagiert

„Optogenetische Werkzeuge lassen sich nutzen, um Proteine gezielt in den Zellkern zu dirigieren.“

auf Lichtteilchen (Photonen) und erlaubt damit, Signale weiterzuleiten oder zu unterdrücken. Aktuell werden von Optogenetikern in erster Linie Photorezeptoren genutzt – Proteine, die ihre Struktur natürlicherweise unter dem Einfluss von Licht verändern und äußere Lichtsignale in intrazelluläre Signale umwandeln können.

## Einflussreiche Fusionen

Werden die lichtempfindlichen Abschnitte (Domänen) von Photorezeptoren mit denjenigen Domänen von Proteinen fusioniert, die in der Zelle eine bestimmte Funktion ausüben, wird es möglich, zelluläre Prozesse sehr gezielt durch Licht zu beeinflussen. Ein Beispiel ist eine Variante des Proteins „Rac1“, das sich mittels Photonen aktivieren lässt. Als optogenetisches Werkzeug lässt sich Rac1 beispielsweise nutzen, um die Organisation des zellulären Skeletts (Zytoskelett) zu steuern. Ebenso lässt es sich verwenden, um Zellen dazu zu veranlassen, sich zu bewegen. Andere optogenetische Werkzeuge, die wir in Heidelberg entwickelt haben, eignen sich, um Proteine gezielt in den Zellkern zu dirigieren.

In der Grundlagenforschung bietet sich die Optogenetik als Methode an, um die Dynamik von Proteinen in lebenden Zellen zu untersuchen und ihre Funktion in zellulären Signalwegen und Netzwerken besser zu verstehen. Ein Beispiel sind Transkriptionsfaktoren – Proteine, die Gene an- und abschalten können. Dazu müssen sie vom Zytoplasma in den Zellkern transportiert werden. Entscheidend für das grundlegende Verständnis zellulärer Prozesse ist also nicht nur das Wissen darüber, welche Struktur ein Protein hat, sondern auch, wann, wo und wie es sich innerhalb der Zelle bewegt.

## LINuS – ein neuer Shuttle-Dienst

Um die Dynamik von Proteinen in der Zelle untersuchen zu können, haben wir gemeinsam mit dem Doktoranden Dominik Niopek aus unserer Gruppe ein neues System entwickelt: „LINuS“. Die Abkürzung steht für „light-inducible nuclear localization signal“. Der wichtigste Bestandteil von LINuS ist ein lichtempfindliches Protein: Phototropin 1 – in der Haferpflanze *Avena sativa* ist es daran beteiligt, dass sich die Pflanze in Richtung des Sonnenlichts bewegt (Phototropismus). Dieses pflanzliche Protein wurde schrittweise in einen Protein-Shuttle-Service umgebaut, der sich mit Licht steuern lässt und auch in menschlichen Zellen funktioniert.

Der Shuttle-Dienst funktioniert mithilfe eines Kernimport-Signals (*nuclear localisation signal*, NLS), das den Transport von Proteinen in den Zellkern vermittelt. Das Kernimport-Signal wird dazu an die Helix – einem bestimmten Molekülteil – der sogenannten LOV2-Domäne des Proteins Phototropin 1 angeheftet. Solange es dunkel ist, bleibt die Helix mitsamt dem angehefteten Kernimport-



PROF. DR. ROLAND EILS ist am Deutschen Krebsforschungszentrum und an der Universität Heidelberg in der Krebsgenomforschung aktiv. Darüber hinaus ist er geschäftsführender Direktor des BioQuant-Zentrums der Universität Heidelberg. Seine Abteilung entwickelt bioinformatische Methoden zur Analyse und Interpretation von Krebsgenomdaten und systembiologische Modelle zur Simulation zellulärer Prozesse. Roland Eils studierte Mathematik und Informatik an der RWTH Aachen und promovierte in Mathematik und Computerwissenschaften an der Universität Heidelberg.

Kontakt: r.eils@dkfz.de

**„Ein pflanzliches Protein lässt sich schrittweise in einen Shuttle-Service umbauen, der mit Licht gesteuert wird und in menschlichen Zellen zum Einsatz kommt.“**



DR. BARBARA DI VENTURA leitet die Arbeitsgruppe für Synthetische Biologie in der Abteilung von Roland Eils am BioQuant-Zentrum der Universität Heidelberg. Sie studierte Computer Engineering an der Universität La Sapienza in Rom und promovierte am European Molecular Biology Laboratory (EMBL) in Heidelberg. Danach arbeitete Barbara Di Ventura als Postdoc am Zentrum für Molekulare Biologie der Universität Heidelberg (ZMBH).

Kontakt: barbara.diventura@bioquant.uni-heidelberg.de

# „Nicht allein die Struktur, auch die Dynamik der Proteine im Innern der Zellen entscheidet über ihre Funktion.“

Signal in der LOV2-Domäne verborgen. In diesem Zustand ist der Shuttle-Dienst inaktiv. Blaues Licht der Wellenlänge von 430 bis 495 Nanometer aber legt das Kernimport-Signal frei. Jetzt kann das Signal von der Kernimport-Maschinerie erkannt werden, und der Transport des markierten Proteins vom Zytoplasma in den Zellkern erfolgt. Wenn man LINuS beispielsweise an das rot fluoreszierende Rezeptorprotein „mCherry“ anfügt, lässt sich anhand der Fluoreszenz genau nachvollziehen, wie sich das Protein nach der Bestrahlung mit blauem Licht vom Zytoplasma in den Zellkern verlagert. Über die Intensität und die Dauer der Lichteinwirkung kann dabei die Stärke des Kernimport-Signals variiert werden – und damit auch die Menge des sich im Zellkern ansammelnden Proteins.

LINuS macht es möglich, Proteine schnell, präzise und reversibel in den Zellkern zu lenken. Deaktivieren lässt sich das Shuttle-System, indem das blaue Licht ausgeschaltet wird. Das Kernimport-Signal ist dann wieder in der LOV2-Domäne verborgen und für die Kernimport-Maschinerie nicht mehr zugänglich. Dies führt zu einer Erholung des Systems: Mit einem eingebauten Signal für den Kernexport (*nuclear export signal*, NES) wird das LINuS-markierte Protein aus dem Zellkern herausgebracht und sammelt sich wieder im Zytoplasma an. Mittels einer

gepulsten Bestrahlung mit blauem Licht lässt sich die Änderung der Lokalisation sogar mehrfach hintereinander auslösen. Bemerkenswerterweise funktioniert dieser Mechanismus nicht nur in einfachen Zellen wie der Hefe, sondern auch in verschiedenen Säugerzellen einschließlich der Zellen des Menschen.

Mittlerweile ist es uns gelungen, verschiedene Versionen von LINuS an die Bedürfnisse unterschiedlicher Proteine anzupassen und gleichsam zu personalisieren. Dies macht es möglich, komplexe raumzeitliche Proteindynamiken in lebenden Zellen detailliert zu untersuchen und lässt darüber hinaus an viele verschiedene Anwendungsmöglichkeiten denken.

Aktuell nutzen wir LINuS beispielsweise, um in einen sehr grundlegenden zellulären Prozess einzugreifen: in die Zellteilung (Mitose). Das ist auch von großer medizinischer Relevanz, etwa im Hinblick auf die Erforschung und Behandlung von Krebs. Krebszellen teilen sich übermäßig und unkontrolliert – womöglich lässt sich unsere neue Methode eines Tages nutzen, um das außer Kontrolle geratene Verhalten bösartig veränderter Zellen mit Lichteinsatz zu beeinflussen. Wir haben dazu in einem ersten Schritt Varianten von Proteinen konstruiert, die natürlicherweise die Teilung von Zellen, den Zellzyklus, steuern. Es zeigte sich,

LIGHT ON, LIGHT OFF

# THE MOLECULAR SWITCH

BARBARA DI VENTURA &amp; ROLAND EILS

A new technology called optogenetics enables researchers to control cell behaviour with light. Scientists at the University of Heidelberg and the German Cancer Research Center (DKFZ) have recently developed a special optogenetic method to translocate proteins into the nucleus of living cells. The function of many proteins is controlled by dynamic changes in their subcellular localisation, thus this new tool will allow the researchers to modulate the dynamics of individual proteins in living cells in order to better understand how they trigger specific cellular responses. The new system is called LINuS – ‘light-inducible nuclear localisation signal’.

LINuS is based on the principle that the nuclear localisation signal is active only when cells are stimulated with light. This system facilitates new studies on intracellular protein movement and is therefore of interest for both basic and applied research. The Heidelberg scientists are currently using LINuS to intervene in a very basic cellular process: cell division. To this end, they fuse proteins that are responsible for controlling the cell cycle with LINuS. The stimulation with light induces the transport of these proteins into the cell nucleus, triggering cell division. These investigations are of high relevance to medicine, for instance with regard to the treatment of cancer. Cancer is characterised by an excessive and uncontrolled division of cells – perhaps one day, LINuS may be used to influence the behaviour of malignant, out-of-control cells, paving the way for new therapies. ●

PROF. DR ROLAND EILS is a cancer genome researcher at the German Cancer Research Center and at Heidelberg University. He is also managing director of the BioQuant Centre of Heidelberg University. His department develops bioinformatical methods for the analysis and interpretation of cancer genome data and systems biology models for the simulation of cellular processes. Roland Eils studied mathematics and computer science at RWTH Aachen and holds a PhD in mathematics and computer science from Heidelberg University.

Contact: r.eils@dkfz.de

DR BARBARA DI VENTURA heads the research group for synthetic biology in the department of Roland Eils at the BioQuant centre of Heidelberg University. She studied computer engineering at the University La Sapienza in Rome and earned her PhD at the European Molecular Biology Laboratory (EMBL) in Heidelberg. Barbara Di Ventura worked as a post-doc at the Center for Molecular Biology of Heidelberg University (ZMBH).

Contact: barbara.diventura@bioquant.uni-heidelberg.de

**“Optogenetic tools can be used to translocate proteins into the cell nucleus. This may open up new possibilities of treating cancer.”**

dass bereits niedrige Konzentrationen eines Komplexes der Zellzyklus-Proteine „Cyclin B1“ und „CDK1“ die Zellteilung einleiten können. Um diesen Prozess mittels Licht zu steuern, haben wir Cyclin B1 und CDK1 jeweils mit LINuS fusioniert und somit unter die Kontrolle des licht-abhängigen Kernimport-Signals gestellt. Dabei haben wir die Proteine mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert, um ihre Dynamik sichtbar zu machen. Nun konnten wir beobachten, dass der zeitgleiche Transport der beiden Proteine in den Zellkern den Beginn der Zellteilung auslöst. Nicht alle Zellen ließen sich via Licht zur Zellteilung veranlassen; der Anteil der sich teilenden Zellen im beleuchteten Bereich war jedoch deutlich erhöht.

Derzeit untersuchen wir weitere krankheitsrelevante Signalproteine mit der von uns entwickelten Methode - und hoffen auf neue Erkenntnisse, die sich therapeutisch nutzen lassen. ●

**„Licht ist ein ideales  
und vergleichsweise  
einfaches Mittel, um  
biologische Prozesse  
zu lenken.“**