

# **Optogenetische G<sub>s</sub>-Stimulation ermöglicht präzise zeitliche und räumliche Stimulationskontrolle in Herzmuskelzellen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

**Philipp Makowka**

aus Bergisch Gladbach

2020

Angefertigt mit der Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Philipp Sasse
2. Gutachter: Prof. Dr. Jan Schrickel

Tag der Mündlichen Prüfung: 03. November 2020

Aus dem Institut für Physiologie 1  
Direktor: Prof. Dr. med. Bernd K. Fleischmann

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	5
<b>1. Deutsche Zusammenfassung</b>	7
1.1 Einleitung	7
1.2 Material und Methoden	11
1.2.1 Generierung des JellyOp-IRES-GFP Plasmides	11
1.2.2 ESC-Kultur, Transfektion und Differenzierung	11
1.2.3 Laktataufreinigung	12
1.2.4 Messung intrazellulärer cAMP-Spiegel	13
1.2.5 Frequenzanalyse von ESC-abgeleiteten Kardiomyozyten	14
1.2.6 Generierung von transgenen Mäusen und Herzgewichtsmessung	15
1.2.7 Stimulation von explantierten Herzen <i>ex vivo</i>	16
1.2.8 Histologie und Immunfluoreszenzfärbung	17
1.2.9 Statistik	18
1.3 Ergebnisse	19
1.3.1 JellyOp ermöglicht Lichtinduzierte G <sub>s</sub> -Stimulation <i>in vitro</i>	19
1.3.2 Optogenetische G <sub>s</sub> -Stimulation in Kardiomyozyten aus JellyOp Mäusen	22
1.3.3 Lokalisierte G <sub>s</sub> -Stimulation in Vorhofgewebe	24
1.4 Diskussion	27
1.4.1 Hohe Lichtsensitivität erfordert technische Anpassung	27
1.4.2 Beeinflussung der Signaltransduktion durch transgene Rezeptorexpression	28
1.4.3 Höhere zeitliche Stimulationskontrolle <i>in vitro</i>	29
1.4.4 JellyOp ermöglicht zeitlich präzise Analyse von lusitropen, chronotropen und inotropen Wirkungen nach G <sub>s</sub> -Stimulation in Kardiomyozyten	30
1.4.5 JellyOp induzierte Arrhythmien	31
1.5 Zusammenfassung	33
1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung	35

<b>2.</b>	<b>Veröffentlichung</b>	45
	Abstract	45
	Introduction	46
	Results and Discussion	46
	Materials and Methods	51
	References	52
<b>3.</b>	<b>Danksagung</b>	54

## Abkürzungsverzeichnis

1D4	Epitop vom C-terminus des Rinderrhodopsins (TETSQVAPA)
Abb.	Abbildung
AC	Adenylylcyclase
ANOVA	Varianzanalyse ( <i>ANalysis Of VAriance</i> )
bpm	Schläge pro Minute (beats per minute)
Ca <sup>2+</sup>	Ionisiertes Calcium
CAG	CMV early enhancer/chicken $\beta$ actin promoter
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CMV	Cytomegalievirus
Cont.	Kontraktion (Contraction)
DMEM	Dulbeccos Modifiziertes Adler-Medium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
EB	Kugelförmige Stammzellkolonie (Embryoid body)
EL <sub>50</sub> -Wert	Halbmaximale effektive Lichtintensität
ESC	Embryonale Stammzelle (embryonic stem cells)
FCS	Fetales Kälber Serum (fetale celver serum)
G418	Geneticin (Aminoglycosid-Antibiotikum)
GFP	Grün fluoreszierendes Protein (green fluorescent protein)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin

$I_{Ca,L}$	L-Typ Calcium-Kanal-Strom
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
IRES	Interne ribosomale Eintrittsstelle
Iso	Isoprenalin
JellyOp	Jellyfish Opsin
Lif	Leukämiehemmender Faktor
min	Minute
mOPN4	Maus Opsin 4 (Melanopsin)
MDL-12.330A	cis-N-(2-Phenylcyclopentyl)-azacyclotridec-1-en-2-amine hydrochloride
opto $\beta$ 2-AR	Chimärer adrenerger Photorezeptor (chimeric rhodopsin/ $\beta$ 2 adrenergic receptor)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
t	Zeit
$\tau$	Zeitkonstante Tau
s	Sekunde
SEM	Mittlerer Standardfehler (standard error of the mean)
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
WT	Wildtyp (wild type)

# 1. Deutsche Zusammenfassung

## 1.1 Einleitung

Auf Zellen innerhalb eines Gewebes wirken verschiedene extrinsische Signale in dynamischen Zeit- und Intensitätsmustern ein. Neben den direkten Auswirkungen übt auch die Variation dieser Aktivitätsmuster tiefgreifende Effekte auf die Signaltransduktion, (Stamm-)Zellentwicklung, Organfunktion oder Krankheitsentwicklung aus. Übliche Technologien zur Manipulation von Zellaktivität (genetisch, pharmakologisch, elektrisch) konnten bisher keine gleichsam hohe zeitliche, räumliche oder zelluläre Präzision erreichen (Repina et al., 2017; Rost et al., 2017).

Die Methode der Optogenetik kombiniert die gezielte gentechnische Integration lichtabhängiger Proteine in Zellen mit modernen Technologien der Bildgebung oder der Lichtapplikation zur Detektion oder Kontrolle dynamischer Prozesse innerhalb lebender Zellen und Organismen (Deisseroth et al., 2006). Hierfür werden natürliche, lichtempfindliche Proteine gentechnisch angepasst oder lichtabsorbierende Chromophore künstlich an Enzyme gekoppelt und anschließend in die Zielzelle oder den Zielorganismus mittels Transfektionstechniken (z. B. Elektroporation oder Virustransduktion) eingebracht (Pudasaini et al., 2015; Rost et al., 2017). Auf diese Weise kann bspw. die kontaktfreie Aktivierung oder Inhibition eines lichtempfindlichen Proteins mittels Licht einer spezifischen Wellenlänge im zeitlichen Bereich von Millisekunden erfolgen (Hegemann und Nagel, 2013). In den Jahren 2002 und 2003 erfolgte erstmalig die erfolgreiche Anwendung der optogenetischen Proteine Channelrhodopsine-1 und 2 (Nagel et al., 2002; Nagel et al., 2003). Mittels gezielter optischer Stimulation erlaubt die Optogenetik eine Zelltyp-spezifische Manipulation einer Zellfunktion mit sehr präziser räumlicher und zeitlicher Auflösung innerhalb eines dreidimensionalen Gewebeverbundes. In der neurophysiologischen Forschung finden optogenetische Methoden eine breite Anwendung zur Beobachtung und selektiven Manipulation des Membranpotentials, der Signaltransduktion oder der synaptischen Transmission in einzelnen Neuronen oder eines neuronalen Netzwerkes im Gewebeverbund (Adesnik, 2018; Deisseroth, 2010; Fenno et al., 2011; Mahmoudi et al., 2017). Auf diese Weise können die Funktionen spezifischer

Netzwerke untersucht und deren Auswirkungen im Rahmen von neurodegenerativen Erkrankungen (Morbus Parkinson, Chorea Huntington, Morbus Alzheimer), Hörverlust oder Epilepsien bewiesen werden (Cepeda et al., 2013; Darrow et al., 2015; Paz et al., 2013; Shimano et al., 2013; Steinbeck et al., 2015; Tønnesen et al., 2009; Yamamoto et al., 2015). Auch im Herzen haben elektrische und hormonelle Stimulationsmuster einen wesentlichen Anteil auf die Organfunktion. Die extrakardiale Anpassung kann hierbei durch direkte Hormoneinwirkung am Arbeitsmyokard oder am Erregungsbildungs- und Erregungsleitungssystem erfolgen (Hancox et al., 1994; Hussain und Orchard, 1997; Irisawa et al., 1993; Klein und Ojamaa, 2001). Hierbei ist die feine, antizyklische Abstimmung der Muskelkontraktionen der Vorhöfe und der Herzkammern, angepasst an die Leistungsansprüche des Herz-Kreislauf-Systems, von besonderer Bedeutung (van Weerd und Christoffels, 2016). Neben der extrakardialen Regulation der Herzaktivität (Herzfrequenz und Schlagvolumen) haben intrakardiale Mechanismen einen wesentlichen Einfluss auf die kurzzeitige Regulation der Kontraktionskraft in Abhängigkeit des enddiastolischen Füllungsvolumens. Über den Frank-Starling-Mechanismus kann das Herz ohne Verzögerung auf eine akute Veränderung der Vor- oder Nachlast reagieren und sowohl den Blutzufuhr als auch den Abfluss aufeinander abstimmen (Frank, 1895; Najafi et al., 2019; Patterson und Starling, 1914). Eine Anpassung in Folge körperlicher Aktivität erfolgt durch das sympathische Nervensystem über interstitielle Freisetzung von v. a. Noradrenalin oder durch Ausschüttung von zirkulierendem Adrenalin aus dem Nebennierenmark, wodurch  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren an Herzmuskelzellen stimuliert werden (Brodde, 1993; Lands et al., 1967). Über die  $G\alpha$ -Untereinheit des heterotrimeren  $G_s$ -Proteins werden Adenylylcyclasen aktiviert und anschließend wird der sekundäre Botenstoff cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) vermehrt synthetisiert (Madamanchi, 2007). Hierdurch kommt es durch Aktivierung der Proteinkinase A zur Phosphorylierung verschiedener Zielproteine (Capote et al., 2015; Lompre et al., 2010; Rockman et al., 2002). Dieser Weg führt durch Erhöhung der Schlagfrequenz und des Schlagvolumens zu einer physiologischen Erhöhung des Herzzeitvolumens. Im Gegensatz dazu kann die chronische Stimulation des  $G_s$ -Signalweges nachteilige Auswirkungen haben, indem sie Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz induziert (Bernardo et al., 2010; Koch, 2004; Lohse et al., 2003; Lompre et al., 2010; Rockman et al., 2002; Xiang, 2011) sowie das Risiko für Herzrhythmusstörungen, insbesondere bei



erkrankten Herzen, erhöht (George, 2008; Lip et al., 2012; Lompre et al., 2010; Rockman et al., 2002; Rockman et al., 2002; Lompre et al., 2010; Xiang, 2011). Lokale Veränderungen des Elektrolyt- und Versorgungshaushaltes (Nährstoffe, Sauerstoff) infolge von Entzündung, Narbenbildung und Ischämie lösen einen chronisch gesteigerten adrenergen Tonus aus, der eine funktionelle und strukturelle Maladaptation der Kardiomyozyten zur Folge hat (Ferguson, 2001; Madamanchi, 2007). Bei konstant erhöhter Ausschüttung von Katecholaminen kommt es zur Überreizung des G<sub>s</sub>-gekoppelten Signalweges und parallel zu Aktivierung anderer Signalwege (zum Beispiel  $\beta$ -Arrestin,  $\beta$ -AR kinase 1), die anschließend zur Desensibilisierung des  $\beta$ 1-adrenergen Rezeptors und zum Verlust der Kontraktilität führen können (Clainig et al., 2002; Esler et al., 1997; Esposito et al., 2002; Freedman und Lefkowitz, 2004; Katz, 1998; Perry und Lefkowitz, 2002). Hierdurch werden u. a. die elektrischen Eigenschaften von Herzmuskelzellen (Aktionspotentialdauer, Weiterleitungsgeschwindigkeit und Refraktärzeit) negativ beeinflusst, was zur Generierung von spontanen Erregungen (Extrasystolen) oder Überleitungsstörungen von elektrischen Signalen (AV-Blöcke, Schenkelblöcke) führen kann. Weiterhin besteht die Gefahr einer unregelmäßigen Ausbreitung der elektrischen Erregung mit dem Risiko des plötzlichen Herztodes durch Entstehung von kreisenden Erregungen mit ventrikulärer Tachykardie oder Kammerflimmern (Sasse et al., 2019; Wagner et al., 2015).

Die Beteiligung der  $\beta$ -Adrenorezeptoren an diesen pathologischen Veränderungen ermöglicht die pharmakologische Therapie durch Inhibition ( $\beta$ -Blocker) mit klarer prognoseverbessernder und lebensverlängernder Wirkung (CIBIS-II Study Group, 1999; Dan et al., 2018; MERIT-HF Study Group, 1999; Lechat et al., 1998; Packer et al., 1996). Die exakten molekularen Ursachen der Umkehr eines physiologischen, leistungssteigernden Stimulationssignales an den  $\beta$ -Adrenorezeptoren in einen pathophysiologischen Effekt bleiben weiterhin unklar. Insbesondere lokale Veränderungen des Stimulationssignales mit veränderten Intensitäts- und Zeitmustern scheinen hierbei eine Rolle zu spielen. Aktuelle Technologien zur Aktivierung der G-Protein Signaltransduktion am Herzen erfordern die Perfusion mit Rezeptoragonisten, denen es aber oft an Zellspezifität mangelt. Zusätzlich begrenzen eine langsame Ein- und Auswaschkinetik sowie eine unkontrollierbare Diffusion des Agonisten die zeitliche und

räumliche Präzision insbesondere bei *in vivo* Experimenten (Beiert et al., 2014). Um diese Limitierungen in der Erforschung lokaler Einflüsse infolge räumlich begrenzter Veränderungen der G<sub>s</sub>-gekoppelten Signalkaskade besser untersuchen zu können, bedarf es einer Zelltyp-spezifischen Manipulation der Zellfunktion mit präziser räumlicher und zeitlicher Auflösung. Als möglichen Lösungsansatz wurde mit dieser Arbeit die Verwendung des natürlichen Opsins aus dem Auge der Würfelqualle „*Carybdea rastonii*“ (Koyanagi et al., 2008), kurz "JellyOp" untersucht. Als Licht-sensitiver und G<sub>s</sub>-gekoppelter Rezeptor ermöglicht JellyOp eine gezielte optische Kontrolle der G<sub>s</sub>-Signalkaskade in Kardiomyozyten *in vitro* und im intakten Herzen.

## 1.2 Material und Methoden

### 1.2.1 Generierung des JellyOp-IRES-GFP Plasmides

Zur Generierung des CAG-JellyOp-IRES-GFP Expressionsvektors wurde das JellyOp-1D4-Epitop Fragment aus dem pcDNA3.1-JellyOp Plasmid (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von R. Lucas, University of Manchester) mittels der Restriktionsenzyme XhoI und SacI herausgeschnitten und in den CAG-mOPN4-IRES-GFP Vektor kloniert, aus dem mOPN4 zuvor durch BamHI/SacI-Exzision entfernt wurde (Beiert et al., 2014). Das Plasmid wurde mittels Sanger-Sequenzierung bestätigt und vor der Transfektion mit BglII linearisiert.

### 1.2.2 ESC-Kultur, Transfektion und Differenzierung

G4-Hybrid-ESCs wurden auf Neomycin-resistenten embryonalen Fibroblasten der Maus in Dulbeccos modifiziertem Adler-Medium (KnockOut DMEM, Invitrogen), ergänzt mit 15 % FCS (PAN-Biotech), 0.1 mM nicht-essentiellen Aminosäuren, 100 U/mL Penicillin, 100 mg/mL Streptomycin, 2 mg/mL L-Glutamin (alle Invitrogen), 0,1 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich) und 500 U/mL Leukämiehemmender Faktor (Lif, Chemicon), kultiviert. Die DNA-Transfektion von  $4 \times 10^6$  ES-Zellen gemischt mit 40  $\mu$ g des linearisierten CAG-JellyOp-IRES-GFP Plasmids erfolgte mittels Elektroporation in PBS (Invitrogen) mit einem elektrischen Impuls (250 V, 500  $\mu$ F, Bio-Rad Gene Pulser). Elektroporierte ESCs wurden ausplattiert und 24 Stunden nach der Transfektion mit 165  $\mu$ g/mL G418 auf Neomycin-resistente Kolonien selektioniert. GFP-positive Klone wurden mittels Fluoreszenz-Mikroskopie ausgewählt und einzeln weiter vermehrt. Im Labor vorhandene ESCs mit GFP-Expression ohne JellyOp unter Kontrolle des CAG-Promotors dienten als Kontrolle. Während der ESC-Kultur wurde kein 9-Cis-Retinal ergänzt. Aus 20.000 ESC Zellen wurden mit Hilfe der „Hanging-Drop“-Methode kugelförmige Stammzellkolonien, so genannte „embryoid bodies“ (EBs), gebildet (Desbaillets et al., 2000; Hescheler et al., 1997). Unter Entzug von Lif führt diese dreidimensionale Struktur zur Ausbildung von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten, die wiederum eine Differenzierung der ESCs in Zelltypen der drei Keimblätter (u. a. Kardiomyozyten) unterstützt. Nach zwei Tagen wurden die EBs aus der Tropfenkultur in

eine Zellkulturschale überführt und drei Tage lang auf einem horizontalen Schüttler in Suspension gehalten. Am fünften Tag der Differenzierung wurden die EBs zur Analyse der Schlagfrequenz und der cAMP-Konzentrationen entweder auf mit 0,1 %-iger Gelantinelösung beschichtete Deckgläser aufgebracht oder zur Selektion von Kardiomyozyten weiterhin in Suspension gehalten (siehe unten).

### 1.2.3 Laktataufreinigung

Die lichtinduzierte cAMP-Produktion von EBs im Vergleich zur pharmakologischen Stimulation (Abb. 1d) wurde am zehnten Tag der Differenzierung durchgeführt. Für eine detailliertere Analyse der Lichtempfindlichkeit in Bezug auf die cAMP-Produktion (Abb. 1e) wurden die Kardiomyozyten mittels Laktatsubstitution anstelle von Glukose purifiziert. Für unsere Zwecke wurde das publizierte Protokoll von Tohyama et al. (2013) für humane Stammzellen zur Anwendung in der murinen Zellkultur mit eigenen Modifikationen angepasst. Mittels des im Folgenden beschriebenen und eigenständig etablierten Protokolls konnten wir erstmalig ESC-abgeleitete murine Kardiomyozyten mittels Laktat-Selektionsmedium isolieren. Hierzu wurden die generierten EBs mit Clustern spontan schlagender Kardiomyozyten in glukosefreiem IMDM Medium (Invitrogen) mit hochkonzentriertem Laktat (4 mM) und 1 % FCS von Tag 8 bis Tag 13 der Differenzierung kultiviert. Ein FCS-Anteil von 5 %, wie in Tohyama et al. beschrieben, führte nicht zu einer ausreichenden Aufreinigung. An Tag 14 wurden die zerfallenen EBs in einem 15 mL Falkenröhrchen mit Kollagenase 4 (280 U/mL in TRIS- Puffer Verhältnis 1:7, Worthington Biochemical Corporation) und 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$  versetzt und mit Hilfe eines Thermomixers (2 x 10 min, 900 U/min, 37 °C) wurden die Zellen dissoziiert. Anschließend wurden die Zellen auf Fibronectin-beschichteten (10 µg/ml) Zellkulturplatten plattiert und in glucosehaltigem IMDM-Medium mit 20 % FCS für einen Tag kultiviert. In den folgenden fünf Tagen wurden die Zellen erneut in laktathaltigem und glukosefreiem IMDM (1 % FCS) gehalten und an Tag 20 ein zweites Mal enzymatisch dissoziiert, gezählt und jeweils 5000 Zellen in Fibronectin-beschichteten 24-Well-Schalen ausplattiert.

#### 1.2.4 Messung intrazellulärer cAMP-Spiegel

Die in Teil 1.2.3 beschriebenen isolierten und aufgereinigten Kardiomyozyten wurden nach Ausplattierung in 20 % IMDM Medium kultiviert. Für cAMP-Messungen wurden die Zellen an Tag 22 verwendet und 30 min vor den Stimulationsexperimenten mit 9-Cis-Retinal (1  $\mu\text{M}$ , Sigma-Aldrich) und 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX, 50  $\mu\text{M}$ , Sigma-Aldrich) inkubiert. Die vorbereiteten Zellen wurden anschließend über 5 Minuten mit variablen Lichtintensitäten (0.03, 0.12, 0.39, 3.92, 6, 15, 39, 60, 203, 603  $\mu\text{W}/\text{mm}^2$ ) mittels eines Makroskops (MVX10, Olympus), ausgestattet mit einem 1x Objektiv (MVPLAPO), einer fluoreszenzmikroskopischen Lichtquelle (X-Cite 120PC, Lumen Dynamics) und einem 475/64 Bandpassfilter (AHF Analysetechnik), beleuchtet. Anschließend wurden die Zellen entsprechend der Protokollangaben mit einem Fluoreszenz-basierten Immunoassay (time resolved fluorescence competitive immunoassay - cAMP dynamic 2 kit, Cisbio) analysiert. Hierzu wurden die Zellen im Lysis & Detection Buffer 1 (im Kit enthalten) über 1 h bei Raumtemperatur lysiert. Anschließend wurden jeweils 10  $\mu\text{L}$  Lysatproben mit 5  $\mu\text{L}$  cAMP-d2 working solution und 5  $\mu\text{L}$  anti-cAMP-Cryptate working solution (im Kit enthalten) versetzt und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Fluoreszenz-Signale wurden mittels eines Fluoreszenz-Readers (Infinite F200 PRO, Tecan) gemäß den Herstellerangaben gemessen. Mittels einer Standardkurve ließ sich eine Korrelation zwischen den ermittelten Fluoreszenz-Signalen und der cAMP-Konzentration bestimmen.

Für die cAMP-Bestimmung der nicht-aufgereinigten EBs wurden diese am fünften Tag der Differenzierung auf mit 0,1 %-iger Gelantinelösung beschichtete Deckgläser plattiert und cAMP-Konzentrationsmessungen an Tag 10 der Differenzierung durchgeführt. Hierzu wurden EBs 30 min vor Beginn der Stimulationsexperimente mit 9-Cis-Retinal (1  $\mu\text{M}$ , Sigma-Aldrich), 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX, 50  $\mu\text{M}$ , Sigma-Aldrich) und teilweise mit MDL-12.330A (Sigma-Aldrich) inkubiert. Anschließend wurden die EBs entweder mit 2.86  $\text{mW}/\text{mm}^2$  über 5 min beleuchtet, mit 1  $\mu\text{M}$  Isoprenaline über 5 min inkubiert oder nicht stimuliert und über 5 min bei Dunkelheit und Raumtemperatur belassen. Direkt nach der Stimulation wurden EBs in Lysis-Buffer lysiert und mit dem oben genannten cAMP dynamic 2 kit identisch analysiert.

Für die Messung von cAMP aus Vorhofgewebe wurde der linke und rechte Vorhof von JellyOp-Mäusen entnommen und mit Minutien-Pins in einer silikonbeschichteten 3 cm Kulturschale mit 1 mL Tyrodelösung mit 1  $\mu\text{M}$  9-Cis-Retinal und 100  $\mu\text{M}$  IBMX fixiert. Die Lichtstimulation (2,9  $\text{mW}/\text{mm}^2$ , 5 min) erfolgte mit dem oben beschriebenen Makroskop. Vor der Zelllyse wurde das Vorhofgewebe manuell zerkleinert und für 2 h in einem Thermomixer (21°C und 900 rpm) im Lysis & Detection Buffer aufgelöst. Anschließend wurden die Zellen mit dem oben genannten cAMP dynamic 2 kit identisch analysiert.

### 1.2.5 Frequenzanalyse von ESC-abgeleiteten Kardiomyozyten

Die EBs wurden am fünften Tag der Differenzierung auf Deckgläser, beschichtet mit 0,1 %-iger Gelantinelösung, plattiert und spontane Kontraktionen an Tag 10 der Differenzierung analysiert. 30 Minuten vor dem Experiment wurde das Medium durch Tyrode-Lösung (in mM: 142 NaCl, 5,4 KCl, 1,8  $\text{CaCl}_2$ , 2  $\text{MgCl}_2$ , 10 Glukose und 10 HEPES; pH 7,4) ergänzt mit 1  $\mu\text{M}$  9-Cis-Retinal (Sigma-Aldrich) ersetzt. Während der Experimente wurden die EBs zur Temperatur- (~35°C) und Elektrolytkontrolle ständig mit frischer Tyrode-Lösung ohne 9-Cis-Retinal perfundiert. Die lichtgesteuerte Stimulation von spontan kontrahierenden EBs wurde, wie in Beiert et al. (2014) beschrieben, mit einem LED-Modul (Omicron LEDMOD LAB, 470 nm, Omicron Laserage) durchgeführt, das von einem Signalgenerator (Modell 2100, A-M Systems) betrieben und über eine Glasfaserleitung in ein Axiovert 200 Mikroskop (Zeiss) eingekoppelt wurde. Das Licht wurde mit einem 1 % Neutralsichtfilter gedämpft und mit einem 470 nm Filter (AHF Analysetechnik) sowie einem 20x Fluor-Objektiv (numerische Apertur: 0,75, Zeiss) auf die Zellen gerichtet. Die Lichtintensität wurde am Objektiv mit einem Leistungsmesser und entsprechender Wellenlängenkorrektur (PM100 Powermeter und S130A-Sensor, Thorlabs) bestimmt. Um eine JellyOp-Aktivierung zu vermeiden, wurde eine Infrarot-LED (760 nm, 11,8  $\mu\text{W}/\text{mm}^2$  in der Fokusebene) zur Bildaufnahme verwendet. Spontane Kontraktionen wurde mit einer CCD-Kamera (piA640-210gm, Basler) mit 51 Bildern pro Sekunde aufgezeichnet und mit einer speziell entwickelten Software (LabView, National Instruments) online analysiert. Experimente mit Frequenzen > 270 bpm wurden aufgrund von Fehlern bei der Bilderkennung ausgeschlossen. Für die statistische Analyse wurden nur EBs mit stabiler Schlagfrequenz (regelmäßige basale Schlagfrequenz über 2 min

ohne Unterbrechung oder arrhythmische Episoden) verwendet. Um experimentelles Rauschen einzelner arrhythmischer Kontraktionen zu reduzieren, wurden die Rohdaten der Frequenzaufzeichnungen nach jedem Lichtimpuls mit einer Asym2Sig-Fit-Formel (Origin 8, OriginLab) mathematisch geglättet:

$$(1) \quad y = y_0 + A \frac{1}{1 + e^{-\frac{x - x_c + w_1/2}{w_2}}} \left( 1 - \frac{1}{1 + e^{-\frac{x - x_c + w_1/2}{w_3}}} \right)$$

Die resultierende Anpassungsspur (Abb. 2b, rote Linie) wurde verwendet, um die Spitzenfrequenz und die mittlere Basisfrequenz während der 60 s vor der jeweiligen Stimulation zu bestimmen. Die Zeitkonstanten für die Inaktivierung von Peak zu Plateaufrequenz und für die Deaktivierung von Peak zu Basisfrequenz wurden durch eine exponentielle Zerfallsanpassung bestimmt (ExpDec1, Origin 8).

#### 1.2.6 Generierung von transgenen Mäusen und Herzgewichtsmessungen

Die Tierversuche wurden in Übereinstimmung mit den Richtlinien 2010/63/EG des Europäischen Parlaments (Schutz von Tieren, die für wissenschaftliche Zwecke verwendet werden) durchgeführt und von der lokalen Ethikkommission genehmigt (Az. 84-02.04.2012A146). Wie zuvor durch Bruegmann et al. (2010) beschrieben, wurden die transgene Mäuse durch Aggregation von JellyOp-GFP exprimierenden, transgenen G4-ESCs (40 Chromosomen-Karyotyp) mit diploiden CD-1-Embryonen (Morula-Stadium) erzeugt. Im Anschluss wurden 25 chimäre Mäuse, die durch ihren Fellfarben-Chimärismus identifiziert wurden, mit CD-1-Mäusen gekreuzt, um die Keimbahntransmission zu testen. Nachkommen mit Agouti-Fellfarbe wurden auf Vererbung des Transgens durch Nachweis des GFP-Signals im Schwanzgewebe analysiert.

Herz und Femur der Maus wurden chirurgisch entnommen, von weiterem Gewebe mechanisch gereinigt und 5 h lang bei 37 °C getrocknet. Das Trockenherzgewicht wurde auf die Oberschenkellänge normiert. Das Alter der Mäuse hierbei betrug > 6 Monate.

### 1.2.7 Stimulation von explantierten Herzen *ex vivo*

Mäuse wurden durch Genickbruch getötet, die Herzen explantiert und in Langendorff-Konfiguration mit Tyrode-Lösung perfundiert. Ein bipolares, kardiales Elektrogramm wurde mit einer Silberchlorid-Elektrode am rechten Vorhof und einem Metalllöffel unter der Herzspitze mit einem Bio-Verstärker-Aufnahmesystem (PowerLab 8/30, Animal Bio Amp ML 136, LabChart 7.1 Software, AD Instruments) aufgenommen. Die Beleuchtung erfolgte mit einem Makroskop (MVX10, Olympus), ausgestattet mit einem 1x-Objektiv (MVPLAPO1x) und mit 470 nm LEDs (LEDC5 und LEDD1, Thorlabs oder GCS-0470- 50-A510 LED und BLS-13000-1, Mightex), die am Epifluoreszenzport angebracht wurden. Die Beleuchtungsfläche wurde mit der Zoomfunktion des Makroskops variiert. Die Lichtintensität wurde mit einem Leistungsmesser (PM100 und S130A, Thorlabs) kalibriert.

Um die maximale Frequenzerhöhung während der Lichtstimulation zu bestimmen (Abb. 5c,e), wurde der dorsale Teil des rechten Vorhofs mit supramaximaler Intensität beleuchtet ( $2 \text{ mW/mm}^2$ , 90 s,  $104 \text{ mm}^2$  Fläche). Nach der Rückkehr der Frequenz zur Grundfrequenz wurde das Herz mit Isoprenalin ( $1 \text{ }\mu\text{M}$ , 4 min) zur pharmakologischen  $G_S$ -Stimulation perfundiert. Die Frequenzkurven wurden mit einem Dreiecksfilter (Bartlett, 10 s Fenster) geglättet. Der relative Frequenzgang wurde auf die Baseline normiert, welche als maximale Frequenz der geglätteten Daten im 45 s Zeitintervall vor der Stimulation definiert wurde.

Um die Lichtempfindlichkeit zu analysieren (Abb. 6a,b), wurde der vordere rechte Vorhof mit kurzen Lichtpulsen (100 ms, 470 nm) und schrittweise ansteigenden Lichtintensitäten beleuchtet ( $2\text{-}2600 \text{ }\mu\text{W/mm}^2$ ). Zur Induktion supraventrikulärer Extraschläge (Abb. 6c,d) wurde das dorsale linke Atrium im Bereich der Einmündung der Pulmonalvenen mit  $190 \text{ }\mu\text{W/mm}^2$  für 1 s beleuchtet.

Zur Bestimmung der spektralen Empfindlichkeit von JellyOp (Abb. 5h) wurden 1 s lange Beleuchtungen mit Wellenlängen von 470 nm und 400-700 nm in 50 nm Schritten mit einem Monochromator (OptoScan, Cairn-Research) erzeugt. Zur Bestimmung der Spitzenwellenlänge ( $\lambda_{\text{max}}$ ) wurden normierte Frequenzwerte ( $y$ ) bei der angewandten Wellenlänge  $\lambda$  mit der Govardovskii-Normogrammgleichung versehen (Govardovskii et al., 2000):



$$(2) \quad y = 1/\{exp[A * (a - x)] + exp[B * (b - x)] + exp[C * (c - x)] + D\}$$

mit:

$$x = \frac{\lambda_{max}}{\lambda}, A = 69.7, a = 0.88, B = 28, b = 0.922, C = -14.9, c = 1.104, D = 0.674$$

### 1.2.8 Histologie und Immunfluoreszenzfärbung

In Laktat aufgereinigte Kardiomyozyten und Herzen wurden mit 4 % Formaldehyd fixiert (PanReac AppliChem). Die ESCs wurden mit einem primären Antikörper gegen das 1D4 Rhodopsin-Epitop (1:100, StressMarq), verdünnt in 5 % Eselserum und 0,2 % Triton X (PanReac AppliChem), für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Konjugierter Alexa Fluor 647 Sekundärantikörper (1:400, Invitrogen) verdünnt in 1 µg/mL Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) wurde für 1 h bei Raumtemperatur aufgetragen. Bilder der mittels Laktatselektionsmedium aufgereinigten Kardiomyozyten wurden mit einem inversen Mikroskop aufgenommen (Eclipse Ti2, Nikon; Prime BSI Kamera, Photometrie; Micro-Manager Software). 1D4 Rhodopsinbilder wurden mit dem Richardson-Lucy Total Variation Algorithmus ( $N = 20$ ,  $\lambda = 0.0215$ ) und dem Born und Wolf Point Spreizfunktionsmodell dekonvolviert (DeconvolutionLab2 und PSF Generator Plug-Ins für ImageJ) (Kirshner et al., 2013; Sage et al., 2017).

Kryokonservierte Herzen wurden mit einem Kryotom (Leica) in 10 µm dicke Schnitte geschnitten. Nach einer Permeabilisierung mit 0,2 % Triton X-100 (Fluka) für 10 min und einer Blockade mit 5 % Eselserum (Jackson ImmunoResearch) über 20 min wurden die primären Antikörper gegen das 1D4 Rhodopsin-Epitop (1:400, StressMarq) oder  $\alpha$ -Actinin (1:400, Sigma-Aldrich) verdünnt in 0,5 % Eselserum über 2 h bei Raumtemperatur appliziert. Entsprechende Cy-3 und Cy-5 konjugierte sekundäre Antikörper (1:400, Jackson ImmunoResearch), verdünnt in 1 µg/mL Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich), wurden für 1 h bei Raumtemperatur appliziert. Fluoreszenzbilder von histologischen Schnitten wurden mit einem inversen Mikroskop mit einem optischen Schnittmodul aufgenommen (Axiovert 200 mit ApoTome und AxioVision 4.2, Zeiss).

### 1.2.9 Statistik

Die Statistiken wurden mit GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software) durchgeführt. Die Daten werden als Mittelwert  $\pm$  S.E.M. dargestellt und ein p-Wert  $< 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen. Die n-Werte in den Legenden geben die Anzahl der unabhängig voneinander durchgeführten Experimente (EBs, Kardiomyozyten, Vorhöfe oder Herzen) an. Die Daten wurden auf Normalität (D'Agostino-Pearson-Test) und auf gleiche Varianz (Brown-Forsythe-Test für ANOVA, F-Test für ungepaarten Student's t-Test) getestet. Nicht-normalverteilte Daten in Abb. 4l,m wurden mit dem Wilcoxon signed-rank Test für nicht-parametrische Daten analysiert. Aufgrund ungleicher Varianzen wurden die Daten in den Abb. 1d, 2e mit Welch-ANOVA mit Games-Howell Post-Test getestet. Alle anderen Daten wurden mit einem geeigneten gepaarten und ungepaarten Student's t-Test oder einer ANOVA-Analyse mit Bonferroni Post-Test getestet. Aufgrund des explorativen Charakters dieser Studie konnten die Effektgrößen nicht vorhergesagt werden, sodass eine vorherige Poweranalyse zur Bestimmung der Probengrößen nicht durchgeführt wurde.

## 1.3 Ergebnisse

### 1.3.1 JellyOp ermöglicht Licht-induzierte G<sub>s</sub>-Stimulation *in vitro*

Zur stabilen Expression von JellyOp und GFP sowohl in Zellen der embryonalen Mausstammzelllinie G4 (ESC) als auch in deren abgeleiteten und ausdifferenzierten Kardiomyozyten wurde ein neuer Expressionsvektor kloniert. Durch Kopplung der Zielgene (JellyOp und GFP) an den ubiquitär aktiven Chicken-Actin-Promoter konnte eine stabile Expression in allen Zelltypen ermöglicht werden. Zur vereinfachten Detektion der Lokalisation von JellyOp erfolgte die Transkription des Gens in direkter Kopplung mit einem 1D4-Rhodopsin-Epitop. Gleichzeitig erfolgte die Expression des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) im Cytosol über eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES). Abbildung 1a der Originalpublikation zeigt den schematischen Aufbau des klonierten Vektors. Nach Transfektion des Vektors zeigten transgene JellyOp-ESCs eine cytosolische GFP-Fluoreszenz. Zusätzlich ließ sich mittels Immunfärbung gegen den 1D4-Epitop-Tag eine membrangebundene Lokalisation von JellyOp feststellen (Abb. 1b). Zur funktionellen Testung von JellyOp in Kardiomyozyten erfolgte die Differenzierung der ESCs zu spontan schlagenden Kardiomyozyten innerhalb von Embryoid-bodies (EB). Mittels Immunfluoreszenzfärbung ließen sich  $\alpha$ -Actinin und GFP-positive Kardiomyozyten in EBs identifizieren (Abb. 1c). Die Stimulation von JellyOp-EBs mit blauem Licht (470 nm, 2,9 mW/mm<sup>2</sup>, 5 min) führte zu einem Anstieg der cAMP-Konzentration auf 646 % des basalen Wertes, was einen vergleichbaren Effekt mit der maximalen pharmakologischen Stimulation durch den  $\beta$ -adrenergen Agonisten Isoprenalin (1  $\mu$ M, 5 min) bewirkte (Abb. 1d). Eine pharmakologische Hemmung der Adenylylcyclasen durch den spezifischen Blocker MDL-12.330A (100  $\mu$ M) bewirkte eine signifikante Reduktion der cAMP-Konzentrationen nach Lichtstimulation. Darüber hinaus ließ sich feststellen, dass GFP-exprimierende Kontroll-EBs ohne JellyOp, keine Lichtreaktion zeigten und identische basale cAMP-Werte im Vergleich zu nicht-stimulierten JellyOp EBs in Dunkelheit aufzeigten (Abb. 1d).

Innerhalb eines EBs entstehen nach Lif-Entzug neben Kardiomyozyten auch eine Vielzahl anderer Zelltypen. Um eine selektionierte Analyse der cAMP-Konzentrationen in Kardiomyozyten zu ermöglichen wurde eine von der Arbeitsgruppe um K. Fukuda weiterentwickelte neue, effiziente und nicht-invasive Methode zur metabolischen

Selektion auf Maus-ESC übertragen. Da Kardiomyozyten neben Fettsäuren und Glukose auch Laktat als effiziente Energiequelle nutzen können, erfolgte die Kultur der Zellen in Glukose-freiem, Laktat-substituiertem Medium mit mehreren Schritten der enzymatischen Dissoziation und Zellplattierung (siehe Methoden). Mit dieser Methode konnten Kardiomyozyten zu einem hohen Anteil (>90 %) purifiziert werden. Allerdings wird hierfür eine große Menge an EBs (40 Schalen mit Hängende Tropfen; 10 cm Durchmesser) benötigt, um eine repräsentative Menge an Kardiomyozyten für Experimente zu erhalten (ca. 200.000 Zellen).

Diese Kardiomyozyten wurden nach Selektion mit Lichtpulsen von unterschiedlicher Lichtintensität beleuchtet. Ähnlich zu pharmakologischen Dosis-Wirkungsbeziehungen ließ sich ein Anstieg der cAMP-Werte mit einer sigmoidalen Dosisbeziehung zum Logarithmus der Lichtintensität beobachten (Abb. 1e). Mittels eines Hill1-Fit ließ sich eine halbmaximale Lichtintensität von  $9,9 \mu\text{W}/\text{mm}^2$  bestimmen.

Intrazelluläres cAMP reguliert über direkte Interaktion mit den HCN-Kanälen (hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channels) die Herzfrequenz in Kardiomyozyten des Sinusknoten. Dieser Regulationsmechanismus bewirkt die positiv chronotrope Wirkung nach Stimulation  $G_s$ -gekoppelter  $\beta$ -Rezeptoren (DiFrancesco und Tortora, 1991). Im Vergleich mit nur GFP-exprimierenden EBs zeigte die alleinige Überexpression von JellyOp ohne Beleuchtung keine Änderung der basalen Schlagfrequenz, sodass eine Dunkelaktivität von JellyOp unwahrscheinlich erscheint (Abb. 2a). Um eine positive chronotrope Reaktion auf Lichtstimulation zu charakterisieren, erfolgten kurze Beleuchtungen ( $309 \text{ nW}/\text{mm}^2$ , 20 s) von spontan kontrahierenden Arealen innerhalb von JellyOp-EBs. Dies führte zu einem sofortigen Anstieg der Schlagfrequenz, der sich bei nur GFP-exprimierenden EBs nicht beobachten ließ (Abb. 2b, Film 1 online verfügbar auf <https://www.nature.com/articles/s41467-019-09322-7#Sec20>). Die durch Beleuchtung induzierte Erhöhung der Schlagrate in JellyOp-EBs entsprach den Effekten einer maximalen Stimulation mit Isoprenalin, die sowohl in JellyOp- als auch in GFP-EBs ähnlich war (Abb. 2c,d). Im Gegensatz dazu war der Abfall der Frequenz nach Beendigung der optischen Stimulation signifikant (~5 mal) schneller als nach Auswaschen von Isoprenalin (Abb. 2c,e).

Um eine fein abgestufte Steuerung der Schlagfrequenz zu demonstrieren, wurden kontrahierende EBs mit schrittweise zunehmenden Lichtintensitäten (Pulsdauer 20 s) beleuchtet. Abbildung 2f zeigt die Rohdaten eines repräsentativen Experimentes mit allmählicher Erhöhung der Schlagfrequenz. Detaillierte Analysen von mehreren Experimenten zeigen eine lichtinduzierte Frequenzerhöhung mit sigmoidaler Abhängigkeit vom Logarithmus der applizierten Lichtintensität (Abb. 2g) ähnlich einer Dosis-Wirkungsbeziehung pharmakologischer Rezeptoragonisten. Die Datenpunkte konnten mit der Hill1-Gleichung beschrieben werden, die eine halb maximale effektive Lichtintensität ( $ELI_{50}$ ) von  $8,4 \text{ nW/mm}^2$  und eine maximale Wirkung bei Lichtintensitäten von  $>100 \text{ nW/mm}^2$  beschreibt. Um die Wiederholbarkeit der JellyOp-Stimulation zu belegen, wurden die EBs in Experimenten repetitiv mit 300 s andauernden Intervallen beleuchtet. In den Versuchen ließ sich kein Wirkverlust im Sinne einer Desensibilisierung feststellen. Auch bei einer supramaximalen Stimulation mit bis zu 10-fach höheren Lichtintensitäten konnte kein Wirkverlust bzw. zusätzlicher Wirkeffekt erreicht werden (Abb 2h).

Zur Abklärung, ob eine abgestufte Kontrolle der  $G_S$ -Signalkaskade auch durch Variation der Länge der Lichtimpulse ermöglicht wird, wurden JellyOp exprimierende EBs mit Lichtpulsen zwischen 1 ms und 20 s bei jeweils zwei Lichtintensitäten stimuliert. Beide Lichtintensitäten ( $0,309 \text{ } \mu\text{W/mm}^2$  und  $30,9 \text{ } \mu\text{W/mm}^2$ ) erreichten bei einer Pulsdauer von 20 s einen supramaximalen Effekt (Abb. 3a). Analog zu den Vorexperimenten mit ansteigenden Lichtintensitäten zeigten sich bei Verkürzung der Lichtimpulse geringere Effekte auf die Schlagfrequenz. Die systematische Analyse erbrachte eine sigmoidale Abhängigkeit der Frequenzsteigerung zum Logarithmus der Pulsdauer (Abb. 3a). Hierüber konnte bei  $30,9 \text{ } \mu\text{W/mm}^2$  eine halbmaximale Belichtungszeit von 6,2 ms und bei  $0,309 \text{ } \mu\text{W/mm}^2$  von 415 ms festgestellt werden. Um diese Werte quantitativ zu vergleichen, wurde mittels des planckschen Wirkungsquantums die Menge der applizierten Photonen (Quantendichte) bei jedem Lichtimpuls berechnet. Diese Analysen ergaben, dass identische Mengen applizierter Photonen ähnliche Effekte ergaben, unabhängig davon ob sie mit  $30,9 \text{ } \mu\text{W/mm}^2$  (Abb. 3b, blau) oder  $0,309 \text{ } \mu\text{W/mm}^2$  (Abb. 3b, schwarz) stimuliert wurden. Somit ist die Aktivierung des  $G_S$ -Signalweges durch Stimulation von JellyOp proportional zur Quantendichte. Daher kann zur Titration der

Zellantwort sowohl eine Variation der Lichtintensität als auch der Pulsdauer verwendet werden.

Anhaltende Stimulation von  $\beta$ -Rezeptoren an Herzzellen kann zu einer Desensibilisierung des Rezeptorsignales führen. Hierfür wurden homologe (Arrestin verhindert eine Rezeptorinteraktion mit dem G-Protein) oder heterologe (rezeptorvermittelte Endozytose) Mechanismen beschrieben (Chuang et al., 1996; Lohse et al., 1989; Lohse et al., 1992; Pippig et al., 1993). Um das Verhalten während langanhaltender Stimulation, insbesondere in Hinsicht auf Desensibilisierung, zu untersuchen, wurden EBs mit 10 Minuten langen Lichtpulsen stimuliert. Abbildung 3c zeigt einen repräsentativen Versuch bei dem die Beleuchtung initial zu einer sofortigen Beschleunigung auf maximal  $171,4 \pm 5,3$  % (Mittelwert  $\pm$  S.E.M.,  $n = 16$ ) der basalen Schlagfrequenz führte. Anschließend zeigte sich unter Beleuchtung eine Reduktion des Effektes und Abnahme der Frequenz mit einer Zeitkonstante von  $93,4 \pm 14,0$  s auf eine stabile Frequenz ( $19,8 \pm 2,9$  % über der Basisfrequenz). Eine zweite Stimulation mit gleicher Intensität 60 s nach Beendigung der chronischen Stimulation führte nicht zum initialen Effekt, sondern zu einer reduzierten Antwort (Abb. 3c, rechts). Durch Variation der Pause bis zur zweiten Stimulation konnte bestimmt werden, dass sich die Kardiomyozyten nach 10 min kontinuierlicher Stimulation für mindestens 5 min erholen müssen, um erneut eine vergleichbare Frequenzerhöhung ( $>90$  % der ersten Stimulation) zu erhalten (Abb. 3d, blaue Punkte). Im Gegensatz dazu war die Erholung nach 20 s andauernder Stimulationen sehr viel schneller und eine Erholung ( $>90$  % der ersten Stimulation) konnte bereits nach 20 s Wartezeit erreicht werden (Abb. 3d, schwarze Punkte).

### 1.3.2 Optogenetische $G_S$ -Stimulation in Kardiomyozyten aus JellyOp Mäusen

Die Funktionalität von JellyOp in Herzmuskelzellen konnte in den *in vitro* Experimenten ausführlich überprüft und beschrieben werden. Um die Funktion von JellyOp im intakten Herzen analysieren zu können, wurde aus den JellyOp-G4-ESCs eine transgene Mauslinie generiert. Herzen dieser Mäuse zeigten gute GFP-Expression in den Herzkammern und etwas prominenter in den Vorhöfen (Abb. 4a). Mittels Fluoreszenzmikroskopie von histologischen Schnitten konnte ein cytosolisches GFP-

Signal sowie ein membrangebundenes JellyOp-Signal in ventrikulären Kardiomyozyten detektiert werden (Abb. 4b). JellyOp Mäuse waren lebensfähig und zeigten keinen auffälligen Phänotyp. Bekannterweise führt eine chronische Stimulation von  $G_s$ -gekoppelten Adrenorezeptoren in Kardiomyozyten zu einer pathologischen Herzhypertrophie. Zum Ausschluss solcher Effekte wurde das Herzgewicht bestimmt und zur jeweiligen Oberschenkelänge normiert. Hierbei konnte kein Gewichtsunterschied zwischen JellyOp und Wildtyp-Mäusen festgestellt werden (Abb. 4c), was auf das Fehlen einer hypertrophen Nebenwirkung durch die JellyOp-Expression schließen lässt.

Im Rahmen der elektromechanischen Kopplung führt das eintreffende Aktionspotential zu einer Öffnung der L-Typ- $Ca^{2+}$  Kanäle (Dihydropyridinrezeptor), woraufhin  $Ca^{2+}$ -Ionen aus dem Extra- in den Intrazellulärraum strömen. Hierdurch wird an Ryanodinrezeptoren der Mechanismus der Calcium-induzierten Calcium-Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum induziert, welche die Kontraktion des Herzmuskels bestimmt. Ein wesentlicher Faktor hierfür ist die  $Ca^{2+}$  Leitfähigkeit der L-Typ- $Ca^{2+}$  Kanäle, welche durch  $G_s$ -Stimulation und konsekutiv durch PKA-abhängige Phosphorylierung beeinflusst werden kann. Um diesen Effekt infolge einer optogenetischen Stimulation von JellyOp zu bestimmen, wurden ventrikuläre Kardiomyozyten aus dem Gewebeverbund von Mauserherzen enzymatisch dissoziiert und mit Patch-Clamp- und Kontraktionsmessungen untersucht. Die Abbildungen 4d-f zeigen die Patch-Clamp-Analysen, bei denen die Beleuchtung mit blauem Licht ( $100 \mu W/mm^2$ , 10 s, Übersicht in Abb. 4d) zu einem sofortigen Anstieg des L-Typ- $Ca^{2+}$  Kanalstroms ( $I_{Ca,L}$ , Einzelspuren in Abb. 4e) führte. Einen maximalen Anstieg von  $20,5 \pm 5,4 \%$  (Abb. 4f) konnte innerhalb von  $63,8 \pm 7,9$  s nach Beginn der Beleuchtung festgestellt werden. Im Vergleich dazu zeigte die  $\beta$ -adrenergen Stimulation mit Isoprenalin ( $1 \mu M$ ) einen stärkeren  $I_{Ca,L}$ -Anstieg von  $43,3 \pm 6,7 \%$  (Abb. 4g). Um die Kontraktilität und Entspannungsgeschwindigkeit nach JellyOp Stimulation zu messen, wurden isolierte ventrikuläre Kardiomyozyten elektrisch stimuliert und die Verkürzung durch Kontraktion mit schneller Videomikroskopie analysiert. Ähnlich zu den Effekten auf L-Typ- $Ca^{2+}$ -Kanäle führte die Beleuchtung ( $100 \mu W/mm^2$ , 10 s, Abb. 4h,i,k) zu einer sofortigen Verstärkung der Kontraktionen mit einer maximalen Zunahme von  $218 \pm 70 \%$ . Zusätzlich konnte nach Beleuchtung eine deutlich schnellere Erschlaffung der Muskelkontraktion mit Reduzierung der Relaxations-Zeitkonstante  $\tau_{rel}$  um  $38,6 \pm 6,5 \%$  (Abb. 4h,j,l) gemessen werden. Im direkten Vergleich

der Effekte auf Kontraktion und Relaxation fiel auf, dass die maximale Relaxationsgeschwindigkeit bereits  $46,3 \pm 12,7$  s nach Beginn der Beleuchtung erreicht wurde, der maximale Effekt auf die Kontraktion jedoch erst nach  $92,9 \pm 14,4$  s beobachtet werden konnte (Abb. 4m).

### 1.3.3 Lokalisierte $G_S$ -Stimulation in Vorhofgewebe

Das vegetative Nervensystem wirkt über die Fasern des sympathischen Nervensystems durch Stimulation der  $G_S$ -Signalkaskade positiv chronotrop auf die Eigenfrequenz des Sinusknotens. Durch Bindung von cAMP an unspezifische Kationenkanäle (HCN-Kanäle) wird die Öffnungswahrscheinlichkeit erhöht, wodurch sich die diastolische Depolarisation der Sinusknotenzellen beschleunigt. Zusätzlich bewirkt eine PKA-abhängige Phosphorylierung der L-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanäle eine Reduktion der Aktionspotential-Schwelle und Beschleunigung des Aktionspotential Anstieges.

Um die Möglichkeit einer Regulation der Herzfrequenz mittels JellyOp zu bestimmen, wurden zunächst die Atrien von JellyOp-Mäusen untersucht. Histologische Schnitte zeigten eine cytosolische GFP-Fluoreszenz- und membrangebundene JellyOp-Signale in atrialen Herzmuskelzellen (Abb. 5a). Beleuchtung ( $2,9 \text{ mW/mm}^2$ , 5 min) von isoliertem Vorhofgewebe erhöhte den cAMP-Spiegel signifikant um 224 %, was ähnlich zur Inkubation mit  $1 \mu\text{M}$  Isoprenalin war (Abb. 5b). Der Effekt von Lichtstimulation auf die Herzfrequenz wurde in Langendorff-perfundierten Herzen mit JellyOp-Expression mit Hilfe von EKG-Messungen analysiert. Abbildung 5c veranschaulicht den Frequenzverlauf bei supramaximaler Beleuchtung ( $2 \text{ mW/mm}^2$ , 90 s) des rechten Vorhofs, in dem sich der Sinusknoten befindet. Nach optischer Stimulation konnte eine maximale Beschleunigung der Herzfrequenz um  $44,0 \pm 4,1$  % (Abb. 5c,e) beobachtet werden, die während der Beleuchtung mit einer Zeitkonstante von  $33,5 \pm 18,1$  s auf einen stabilen Wert der Herzfrequenzbeschleunigung von  $28,8 \pm 8,5$  % (Abb. 5c) abfiel. Im Vergleich hierzu führte die pharmakologische Stimulation mit  $1 \mu\text{M}$  Isoprenalin zu höheren maximalen Herzfrequenzen (Abb. 5d,e), jedoch erst nach wesentlich längerer Stimulationsdauer verglichen mit optischer Stimulation (Abb. 5d,f). Im Gegensatz zum lang anhaltenden



Effekt nach Auswaschen von Isoprenalin kehrte die Herzfrequenz nach Beendigung der Beleuchtung schnell wieder auf die Grundfrequenz zurück (Abb. 5g).

Um die spektrale Empfindlichkeit von JellyOp in intakten Herzen zu testen, wurde das rechte Atrium mit monochromatischem Licht im Wellenlängenbereich zwischen 400 und 700 nm bei gleicher Lichtintensität beleuchtet. Eine Beleuchtung mit Wellenlängen zwischen 400 und 550 nm führte zum Frequenzanstieg, Licht mit Wellenlängen  $> 600$  nm hatte kaum einen Effekt (Abb. 5h). Das gemessene Aktivierungs-Spektrum ließ sich mit Hilfe eines mathematischen Fits beschreiben (Abb. 5h, rote Linie), was eine Spitzenwellenlänge ( $\lambda_{\max}$ ) von 493 nm ergab.

In den *in vitro* Experimenten konnte eine kurze Aktivierungszeit im Bereich von Millisekunden beobachtet werden. Um die Kinetik der  $G_S$ -Protein induzierten Herzfrequenzerhöhung zu untersuchen, wurde das rechte Atrium mit kurzen Lichtimpulsen (100 ms,  $1 \text{ mW/mm}^2$ ) beleuchtet und der Frequenzverlauf genau analysiert. Hierbei zeigte sich eine Beschleunigung bereits  $\sim 300$  ms nach Beginn der Beleuchtung (Abb 6a roter Kasten). Die maximale Frequenzzunahme von 14,2 % wurde in diesen Experimenten nach  $17,8 \pm 3,3$  s ( $n = 7$ ) erreicht. Die Anwendung von kurzen Lichtimpulsen (100 ms) mit unterschiedlichen Intensitäten führte zur lichtinduzierten Herzfrequenzerhöhung mit sigmoidaler Abhängigkeit vom Logarithmus der Intensität und einer halbmaximalen Lichtintensität  $EL_{50}$  von  $386 \mu\text{W/mm}^2$  (Abb. 6b).

Lokale pathophysiologische Ereignisse (Ischämie, Minderperfusion, Hypoxie, Entzündung) führen zu einer lokalen Veränderung der  $\beta$ -adrenergen Stimulation. Zur optogenetischen Untersuchung lokalisierter  $\beta$ -adrenerger Effekte im Vorhof wurden submaximale Lichtimpulse ( $190 \mu\text{W/mm}^2$ , 1 s) auf das dorsale linke Atrium angewendet. Ähnlich wie bei Beleuchtung des rechten Vorhofs führte dies zunächst zu einer leichten Beschleunigung des Sinusrhythmus, möglicherweise durch Streulicht auf den Sinusknoten (Abb. 6c, links). Im Gegensatz zur Beleuchtung des rechten Vorhofs mit regelmäßigem Sinusrhythmus trat  $\sim 10$  s nach Beleuchtung des linken Vorhofs ein sehr unregelmäßiger Rhythmus auf (Abb. 6c, rechts). Eine detaillierte Analyse der EKG-Signale zeigte, dass diese Arrhythmie durch spontane vorzeitige atriale Extrasystolen hervorgerufen und durch P-Wellen mit deformierter Morphologie gekennzeichnet wurde

(Abb. 6d, rote Box). Dies deutet auf einen Ursprung außerhalb des Sinusknotens hin, höchstwahrscheinlich aus dem beleuchteten Bereich im linken Vorhof.

## 1.4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die optogenetische Stimulation der  $G_S$ -Protein gekoppelten,  $\beta$ -adrenergen Signalkaskade in stammzellabgeleiteten Kardiomyozyten *in vitro* sowie in murinen intakten Herzen durch erstmalige Verwendung des Lichtsensitiven Photorezeptors JellyOp etabliert. Ferner wurden für diese Arbeit die metabolische Aufreinigung von Herzmuskelzellen mittels Laktat aus murinen Stammzellen etabliert. Die neue Methode der optogenetischen  $G_S$ -Stimulation wurde im Detail mit dem Ergebnis einer sehr hohen Lichtsensitivität sowie sehr hoher räumlicher und zeitlicher Präzision charakterisiert. Diese Eigenschaften und mögliche Anwendungsgebiete werden folgend diskutiert.

### 1.4.1 Hohe Lichtsensitivität erfordert technische Anpassung

Insbesondere bei der Durchführung der *in-vitro*-Analysen zeichnete sich eine sehr hohe Lichtempfindlichkeit von JellyOp ab und führte zu neuen Herausforderungen im allgemeinen Umgang mit den Zellen sowie bei der Durchführung von Experimenten. Die verwendeten Lichtintensitäten, die zur Aktivierung von JellyOp benötigt wurden, sind um den Faktor  $10^4$ - $10^5$  geringer als die für die optogenetische Depolarisation von Herzmuskelzellen mit Channelrhodopsin2 ( $\sim 1 \text{ mW/mm}^2$  entnommen aus Bruegmann et al. 2010) oder für die Stimulation des künstlichen, lichtempfindlichen, chimären  $G_S$ -gekoppelten-Rezeptors opto $\beta$ 2-AR (geschätzt aus dem cAMP-Assay in Airan et al. 2009). Als Folge konnte bspw. die Videomikroskopie zur Detektion der Schlagfrequenzen nur mit Infrarot-LED-Beleuchtung (760 nm,  $11,8 \text{ }\mu\text{W/mm}^2$ ) durchgeführt werden. Normales, weißes Mikroskoplicht führte bereits bei der Beobachtung zu einer Aktivierung von JellyOp und folglich zu einer Erhöhung der basalen Schlagfrequenz. Die ermittelte Spitzenwellenlänge von JellyOp von 493 nm mit einem Sensitivitätsbereich von 400 nm bis 550 nm (Abb. 5h) entspricht dem berichteten Wirkungsspektrum von Wildtyp JellyOp (Gerrard et al., 2018). Die Intensität des normalen Raumlichts bei diesen Wellenlängen betrug  $\sim 25 \text{ }\mu\text{W/mm}^2$  und führte damit zu einer basalen Aktivierung der  $G_S$ -Signalkaskade.

Daher war es erforderlich alle Funktionsexperimente in dunklen Räumen mit schwacher Beleuchtung von roten ( $> 650$  nm) LEDs durchzuführen.

Die hohe Lichtempfindlichkeit bietet jedoch auch Vorteile durch geringe Phototoxizität oder ausbleibende Erhöhung der Gewebetemperatur, was bei Lichtintensitäten von  $> 1$  mW/mm<sup>2</sup> zu unspezifischen Reaktionen oder Zell- und Gewebeschäden führen kann (Beppu et al., 2016; Hockberger et al., 1999; Remington, 2006). Dies ermöglicht Experimente sowohl *in vivo* als auch *in vitro* über einen langen Zeitraum und könnte daher genutzt werden, um die Auswirkungen einer chronisch anhaltenden oder pulsierenden G<sub>s</sub>-Stimulation z. B. auf Signaltransduktion, Zelldifferenzierung oder Entwicklung von Herzhypertrophie zu untersuchen.

#### 1.4.2 Beeinflussung der Signaltransduktion durch transgene Rezeptorexpression

Aufgrund von transgener Überexpression von Photopigmenten in Zellen konnten in früheren Arbeiten verschiedene Störartefakte in der Signaltransduktion beobachtet werden. Hierzu zählen Restautoaktivität (Dunkelaktivität), ungünstige Proteininteraktionen, Wirkverlust des Chromophors, Veränderung des Aktivitätstonus der Signalkaskade oder unselektive Kopplung von Rezeptoren mit Effektoren (Bailes et al., 2012; Hall und Lefkowitz, 2002; Lee et al., 2008; Stierl et al., 2011; Zhu et al., 2003). Die Bildung des second messenger cAMP bildet den ersten Schritt der G<sub>s</sub>-gekoppelten Signaltransduktion. Die in Abbildung 1d und e dargestellten Ergebnisse zeigen deutlich, dass die optogenetische Stimulation mit JellyOp eine feine Kontrolle über den cAMP-Spiegel ermöglicht und diese durch Aktivierung der Adenylylcyclase innerhalb einer physiologischen G<sub>s</sub>-Signalkaskade vermittelt ist. Diese Ergebnisse stimmen mit denen aus der Erstbeschreibung von JellyOp als optogenetisches Werkzeug in HEK 293 Zellen überein, die darüber hinaus keinen Effekt durch G<sub>q</sub>- oder G<sub>i</sub>-Proteine feststellen konnten (Bailes et al., 2012). Die Aktivierung anderer G-Proteine und intrazellulärer Wege (Arrestin, CaMKII) durch JellyOp kann jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Besonders relevant für die experimentelle Anwendung eines optogenetischen Proteins ist das Fehlen einer basalen Dunkelaktivität. Chronische  $\beta$ -adrenerge Stimulation des

Herzens führt zu Veränderungen im intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Handling und konsekutiv zu Herzhypertrophie (Feldmann et al., 2005; Lohse et al., 2003; Madamanchi, 2007). Da sich das Gewicht von JellyOp-Herzen nicht von Kontrollherzen unterscheidet (Abb. 4c), konnte ein hypertropher Effekt und damit indirekt eine chronische  $G_s$ -Stimulation ausgeschlossen werden. Weiterhin wurden keine Unterschiede im basalen cAMP-Spiegel (Abb. 1d) oder der basalen Schlagfrequenz (Abb. 2a,b) zwischen JellyOp und EGFP EBs festgestellt. Zusammengenommen kann durch diese Ergebnisse eine relevante JellyOp-Dunkelaktivität ausgeschlossen werden.

Die Überexpression von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren könnte durch Bindung und Entzug von G-Proteinen die native Signalkaskade negativ beeinflussen. Direkte Vergleiche von optischer mit pharmakologischer Stimulation ergaben jedoch vergleichbare Effekte auf den cAMP-Konzentrationsanstieg (Abb. 1d,5b) sowie auf die stimulierte Schlagfrequenz *in vitro* (Licht: 79 %, Isoprenalin: 87 %, Abb. 2c,d). Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass die JellyOp-Expression die native  $\beta$ -adrenerge Signalkaskade weder sensibilisiert noch hemmt.

#### 1.4.3 Höhere zeitliche Stimulationskontrolle *in vitro*

Infolge optogenetischer Aktivierung des  $G_s$ -Signalweges kann eine sehr viel höhere zeitliche Präzision erzielt werden als nach pharmakologischer Stimulation (Abb. 2c,e). Dies ermöglicht repetitive Stimulation mit reproduzierbaren Ergebnissen (Abb. 2f,h). Die hierbei benötigte Wartezeit zwischen Stimulationen ( $\sim 30$  s, Abb. 3d) ist wesentlich kürzer als die Deaktivierung nach Auswaschen pharmakologischer Stimulation ( $\sim 150$  s, Abb. 2e). Eine Analyse der Dosis-Wirkungs-Beziehungen (Abb. 2f,g,h und 3a,b) kann hierdurch sehr viel schneller und genauer bestimmt werden als mit Ein- und Auswaschen von Rezeptor-Agonisten. Im Gegensatz zur Verwendung des artifiziellen, chimären,  $G_s$ -gekoppelten Rezeptors opto $\beta 2$ -AR, bei dem nach einmaliger Stimulation eine lange Wartezeit notwendig ist (Bailes et al., 2017), konnte bei kurzen, repetitiven Stimulationen von JellyOp keine Wartezeit oder Reduktion der Rezeptorantwort beobachtet werden (Abb. 2f,g,h,3d). Voraussetzung hierfür sind ein natürliches Vorkommen des

Chromophores (9-Cis Retinal) in der Zelle sowie ein schnelles Inaktivieren und Recycling des aktivierten Chromophores (Katz und Baruch, 2009; Kane et al., 2005).

Zusammengefasst kann JellyOp in Kardiomyozyten *in vitro* verwendet werden, um schnelle Stimulationsmuster mit kurzen Belichtungszeiten (< 20 s) ohne Desensibilisierung zu imitieren. Da kurze und sich wiederholende Stimulationen mit Rezeptoragonisten technisch sehr anspruchsvoll oder undurchführbar sind, bietet der optogenetische Ansatz die Möglichkeit die differentielle Wirkung von lang-anhaltenden vs. pulsatil-repetitiven Aktivierungsmustern zu untersuchen. Gepaart mit einer detaillierten Analyse der Signaltransduktion können die Auswirkungen von Refraktärität, Regeneration und Desensibilisierung von G-Proteinen und ihrer nachgelagerten Effektoren untersucht werden (Bailes et al., 2017; Conner et al., 1997; Luttrell und Lefkowitz, 2002).

#### 1.4.4 JellyOp ermöglicht zeitlich präzise Analysen von lusitropen, chronotropen und inotropen Wirkungen nach $G_S$ -Stimulation in Kardiomyozyten

Beim Vergleich der JellyOp-Stimulation mit der pharmakologischen Stimulation von  $\beta$ -Rezeptoren mit Isoprenalin wurden *in vitro* ähnliche Effekte auf die Schlagraterhöhung von ESC-basierten Kardiomyozyten beobachtet. Allerdings ließ sich in ventrikulären Kardiomyozyten eine signifikant geringere Wirkung von Licht auf den  $ICa,L$  (Licht: 21 %, Isoprenalin: 43 %, Abb. 4f,g) feststellen. Auch die Herzfrequenz im intakten Herzen ließ sich mit Licht nicht so effektiv stimulieren (Licht: 44 %, Isoprenalin: 58 %, Abb. 5e). Es ist daher nicht vollständig auszuschließen, dass JellyOp auch  $G_i$ -Proteine leicht aktiviert und damit den  $G_S$ -Effekt reduziert. Im Vergleich zum transgen überexprimierten JellyOp-Rezeptor könnten  $\beta$ -Rezeptoren in Mikrodomänen eine privilegierte Signaltransduktion an die  $G_S$ -Proteine und die AC besitzen. Die Kombination von JellyOp mit Arrestin- oder Phosphodiesterase-interagierenden Proteinsequenzen der  $\beta_1$ - oder  $\beta_2$ -Rezeptoren könnte ein sehr leistungsfähiges Werkzeug sein, um den Einfluss makromolekularer Signalkomplexe auf den  $\beta$ -adrenergen Signalweg mit hoher zeitlicher Auflösung zu bestimmen (Bailes et al., 2017; Richter et al., 2008). Die Experimente zur Kinetik der JellyOp-Effekte liefern einen Hinweis auf Kompartimentierung des  $G_S$ -Signalweges, da

nach Beginn der Beleuchtung ein signifikant schnellerer Effekt auf die maximale Entspannungsgeschwindigkeit ( $46,3 \pm 12,7$  s) als auf die maximale Kontraktion ( $92,9 \pm 14,4$  s) festgestellt werden konnte (Abb. 4h,m). Dies könnte auf eine privilegierte Phosphorylierung der Phospholamban-Mikrodomäne im Vergleich zur cytosolischen Phosphorylierung von L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen und Ryanodin-Rezeptoren hinweisen (Sprengler et al., 2015). Der schnelle Effekt auf die Entspannungsgeschwindigkeit nach  $\beta$ -adrenerger Stimulation steht im Einklang mit der kinetischen Analyse der Phospholamban-Phosphorylierung in isolierten Herzmuskelzellen der Maus oder schockgefrorenen Rattenherzen (Kuschel et al., 1999; Li et al., 2000).

Bei Betrachtung der zeitlichen Kinetik der Herzfrequenz (Peak in  $< 20$  s; Abb. 5f,6a) gegenüber den Effekten in isolierten ventrikulären Herzmuskelzellen (Peak  $\text{ICa,L}$  in  $\sim 100$  s; Abb. 4d) zeigt sich ein 5-facher Unterschied, welcher höchstwahrscheinlich durch die direkte Wirkung von cAMP auf die HCN-Kanäle in Sinusknotenzellen verursacht wird (DiFrancesco und Tortora, 1991). Kohärent hierzu ließen sich in den *in vitro* Analysen bei Lichtintensitäten von  $100 \text{ nW/mm}^2$  lediglich leichte Effekte auf die intrazelluläre cAMP-Konzentration, aber deutliche Effekte auf die Schlagfrequenz feststellen (Abb. 1e,2g). Die sehr kurze Verzögerung zwischen Lichtapplikation und Steigerung der Herzschlagrate ( $\sim 300$  ms; Abb. 6a) korreliert mit aktuellen Berichten, die eine optogentische Stimulation von kardialen sympathischen Neuronen verwendet (Prando et al., 2018; Wengrowski et al., 2015).

#### 1.4.5 JellyOp induzierte Arrhythmien

Ektopie Kontraktionen im Vorhof können Vorhofflimmern induzieren, haben ihren Ursprung meistens in der Region der Lungenvenenostien im linken Vorhof und treten besonders nach Stimulation des autonomen Nervensystems auf (Irie et al., 2017; Ouyang et al., 2006; Patterson et al., 2005). Passend dazu führte die Beleuchtung des linken Vorhofes zu ektopen atrialen Kontraktionen mit veränderter Morphologie der P-Wellen im Vergleich zum regelmäßigen Sinusrhythmus (Abb. 6c,d). Dies deutet darauf hin, dass die Erregung außerhalb des Sinusknotens und höchstwahrscheinlich im beleuchteten

Bereich entstand. Bei Beleuchtung des rechten Vorhofs von JellyOp-Mäusen mit identischen Parametern konnten keine ektope Kontraktionen beobachtet werden.

Obwohl eine  $G_S$ -induzierte spontane Erregung in beleuchteten Herzmuskelzellen sehr wahrscheinlich erscheint, kann aufgrund des Fehlens einer zelltypspezifischen Expression von JellyOp keine endgültige Aussage über den Mechanismus und die beteiligten Zelltypen getroffen werden. Eine zelltypspezifische Expression von JellyOp mittels Cre/LoxP-Systemen in Kardiomyozyten, Fibroblasten, Endothel- und glatten Muskelzellen wird es in Zukunft ermöglichen, die direkten und parakrinen Effekte der  $\beta$ -adrenergen Signalkaskade in den verschiedenen Zelltypen des Herzens und die Wirkung auf Herzrhythmusstörungen zu analysieren.



## 1.5 Zusammenfassung

Die zelluläre Funktion und Aktivität von Kardiomyozyten wird durch extrinsische Signale (insbesondere durch das vegetative Nervensystem) mit dynamischen Zeit- und Intensitätsmustern an die körperliche Belastung angepasst. Als bedeutsamster Adrenozeptor am Herzen vermittelt der  $G_s$ -Protein gekoppelte  $\beta_1$ -Rezeptor hierbei, abhängig von Signalstärke und Signallänge, sowohl physiologische als auch pathophysiologische Anpassungsreaktionen. Aufgrund des hohen Stellenwertes für die Regulation der Herztätigkeit nimmt er bei der Erforschung und Therapie kardialer Erkrankungen als auch bei Herzrhythmusstörungen eine zentrale Rolle ein. Die Standardtechnik zur Untersuchung adrenerger Auswirkungen auf die Herzfunktion ist die Perfusion mit pharmakologischen Rezeptor-Agonisten. Diese Methode bietet jedoch keine hohe zeitliche, räumliche oder zellspezifische Präzision, sodass z. B. pulsatile Stimulationsmuster mit wechselnden Intensitäten nur unscharf und mit hohem technischem Aufwand erzielt werden können. Mit dieser Arbeit zeigen wir erstmals, dass der lichtempfindliche  $G_s$ -Protein gekoppelte Rezeptor JellyOp eine optische Stimulation der adrenergen Signalkaskade in Kardiomyozyten und dem gesamten Herzen ermöglicht. Die Beleuchtung von JellyOp erzielte, im Vergleich zur pharmakologischen Stimulation mit Rezeptoragonisten, sehr ähnliche Effekte auf die Steigerung von cAMP-Konzentrationen oder der Schlagfrequenzen in Stammzell-abgeleiteten Herzmuskelzellen. Durch Verwendung der optogenetischen Stimulation wurde jedoch eine hochpräzise zeitliche Kontrolle über die Signaltransduktion mit sehr schnellen An- und Ausschaltkinetiken ermöglicht. Zur Analyse der Rezeptorfunktion in intakten Herzen wurde eine transgene Mauslinie mit JellyOp-Expression in Herzmuskelzellen generiert. Die Beleuchtung von isolierten, ventrikulären Kardiomyozyten dieser Mäuse ermöglicht eine zeitlich sehr präzise Verstärkung der  $Ca^{2+}$ -Ströme, der fraktionierten Zellverkürzung und der Relaxationsraten. Durch räumliche Fokussierung der Lichtstimulation konnten unterschiedliche Effekte der  $G_s$ -Signaltransduktion im linken und rechten Vorhof festgestellt werden. Während die lokale Stimulation des rechten Vorhofes zu einer physiologischen Zunahme der Herzfrequenz führte, wurden bei Beleuchtung des dorsalen linken Atriums supraventrikuläre Extraschläge induziert, die auf pro-arrhythmische Effekte der adrenergen Signale in diesem Bereich hinweisen.

Zusammengefasst ermöglicht die Expression von JellyOp eine lokalisierte und zeitlich hochpräzise optogenetische Stimulation der  $G_S$ -Signalkaskade in Herzmuskelzellen durch Beleuchtung. Zukünftig könnte diese neue Methode eingesetzt werden, um physiologische und pathophysiologische Effekte ortsspezifischer, langanhaltender und pulsatile  $G_S$ -Aktivierung zu untersuchen.

## 1.6 Literaturverzeichnis

Adesnik H. Cell Type-Specific Optogenetic Dissection of Brain Rhythms. *Trends in Neurosciences*. 2018. 41: 122-124

Airan RD, Thompson KR, Fenno LE, Bernstein H, Deisseroth K. Temporally precise in vivo control of intracellular signalling. *Nature*. 2009. 458: 1025-1029

Bailes HJ, Milosavljevic N, Zhuang LY, Gerrard EJ, Nishiguchi T, Ozawa T, Lucas RJ. Optogenetic interrogation reveals separable G-protein-dependent and -independent signalling linking G-protein-coupled receptors to the circadian oscillator. *BMC Biology*. 2017. 15: 40

Bailes HJ, Zhuang LY, Lucas RJ. Reproducible and Sustained Regulation of Gas Signalling Using a Metazoan Opsin as an Optogenetic Tool. *PLoS ONE*. 2012. 7: 30774

Beppu K, Sasaki T, Tanaka KF, Yamanaka A, Fukazawa Y, Shigemoto R, Matsui K. Optogenetic countering of glial acidosis suppresses glial glutamate release and ischemic brain damage. *Neuron*. 2014. 81: 314-320

Bernardo BC, Weeks KL, Pretorius L, McMullen JR. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: Experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacology and Therapeutics*. 2010. 128: 191-227

Bruegmann T, Malan D, Hesse M, Beiert T, Fuegemann CJ, Fleischmann BK, Sasse P. Optogenetic control of heart muscle in vitro and in vivo. *Nature Methods*. 2010. 7: 897-900

Capote LA, Mendez Perez R, Lympelopoulos A. GPCR signaling and cardiac function. *European Journal of Pharmacology*. 2015. 763: 143-148

Cepeda C, Galvan L, Holley SM, Rao SP, André VM, Botelho EP, Chen JY, Watson JB, Deisseroth K, Levine MS. Neurobiology of Disease Multiple Sources of Striatal Inhibition Are Differentially Affected in Huntington's Disease Mouse Models. *Journal of Neuroscience*. 2013. 33: 7393-7406

Chuang TT, Iacovelli L, Sallese M, De Blasi A. G protein-coupled receptors: Heterologous regulation of homologous desensitization and its implications. *Trends in Pharmacological Sciences*. 1996. 17: 416-421

Claing A, Laporte SA, Caron MG, Lefkowitz RJ. Endocytosis of G protein-coupled receptors: Roles of G protein-coupled receptor kinases and  $\beta$ -arrestin proteins. *Progress in Neurobiology*. 2002. 66: 61-79

Claing A, Laporte SA, Caron MG, Lefkowitz RJ. Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin proteins. *Progress in Neurobiology*. 2002. 66: 61-79

Conner DA, Mathier MA, Mortensen RM, Christie M, Vatner SF, Seidman CE, Seidman JG.  $\beta$ -Arrestin1 knockout mice appear normal but demonstrate altered cardiac responses to  $\beta$ -adrenergic stimulation. *Circulation Research*. 1997. 81: 1021-1026

Dan GA, Martinez-Rubio A, Agewall S, Boriani G, Borggrefe M, Gaita F, Van Gelder I, Gorenek B, Kaski JC, Kjeldsen K, Lip GYH, Merkely B, Okumura K, Piccini JP, Potpara T, Poulsen BK, Saba M, Savelieva I, Tamargo JL, Wolpert C, Sticherling C, Ehrlich JR, Schilling R, Pavlovic N, De Potter T, Lubinski A, Svendsen JH, Ching K, Sapp, JL, Chen-Scarabelli C, Martinez F. Antiarrhythmic drugs-clinical use and clinical decision making: A consensus document from the European Heart Rhythm Association (EHRA) and European Society of Cardiology (ESC) Working Group on Cardiovascular Pharmacology, endorsed by the Heart Rhythm Society (HRS), Asia-Pacific Heart Rhythm Society (APHRS) and International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy (ISCP). *Europace*. 2018. 20: 731-732

Dargie HJ, Lechat P. The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study II (CIBIS-II): A randomised trial. *Lancet*. 1999. 353: 9-13

Darrow KN, Slama MCC, Owoc M, Kozin E, Hancock K, Kempfle J, Edge A, Lacour S, Boyden E, Polley D, Christian Brown M, Lee DJ. Optogenetic stimulation of the cochlear nucleus using channelrhodopsin-2 evokes activity in the central auditory pathway HHS Public Access. *Brain Research*. 2015. 1599: 44-56

Deisseroth K. Controlling the brain with light. *Scientific American*. 2010, 303 (5): 48-55

Deisseroth K. Optogenetics. *Nature Methods*. 2011. 8: 26-29

Deisseroth K, Feng G, Majewska AK, Miesenböck G, Ting A, Schnitzer MJ. Next-generation optical technologies for illuminating genetically targeted brain circuits. *Journal of Neuroscience*. 2006. 26: 10380-10386

Desbaillets I, Ziegler U, Groscurth P, Gassmann M. Embryoid Bodies: An *In Vitro* Model of Mouse Embryogenesis. *Experimental Physiology*. 2000. 85: 645-651

DiFrancesco D, Tortora P. Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. *Nature*. 1991. 351: 145-147

Esler M, Kaye D, Lambert G, Esler D, Jennings G. Adrenergic nervous system in heart failure. *American Journal of Cardiology*. 1997. 80 11A 7L-14L

Esposito G, Rapacciuolo A, Naga Prasad SV, Takaoka H, Thomas SA, Koch WJ, Rockman HA. Genetic alterations that inhibit in vivo pressure-overload hypertrophy prevent cardiac dysfunction despite increased wall stress. *Circulation*. 2002. 105: 85-92

Feldman DS, Carnes CA, Abraham WT, Bristow MR. Mechanisms of Disease:  $\beta$ -adrenergic receptors-alterations in signal transduction and pharmacogenomics in heart failure. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine*. 2005. 2: 475-483

Fenno L, Yizhar O, Deisseroth K. The Development and Application of Optogenetics. *Annual Review of Neuroscience*. 2011. 34: 389-412

Ferguson SSG. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: The role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacological Reviews*. 2001. 53: 1-24

Frank O. On the dynamics of cardiac muscle. *American Heart Journal*. 1959. 58: 282-317

Freedman NJ, Lefkowitz RJ. Anti- $\beta$  1-adrenergic receptor antibodies and heart failure: causation, not just correlation. 2004. *The Journal of Clinical Investigation*. 2004. 113: 1379-1382

Fu Q, Chen X, Xiang YK. Compartmentalization of Beta-Adrenergic Signals in Cardiomyocytes. 2013. 23: 250-256

George CH. Sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> leak in heart failure: mere observation or functional relevance?. *Cardiovascular Research*. 2008. 77: 302-314

Gerrard E, Mutt E, Nagata T, Koyanagi M, Flock T, Lesca E, Schertler GFX, Terakita A, Deupi X, Lucas RJ. Convergent evolution of tertiary structure in rhodopsin visual proteins from vertebrates and box jellyfish. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America (PNAS)*. 2018. 115: 6201-6206

Govardovskii VI, Fyhrquist N, Reuter T, Kuzmin D. In search of the visual pigment template. *Visual Neuroscience*. 2000. 17: 509-528

Hall R, Lefkowitz R. Regulation of G protein-coupled receptor signaling by scaffold proteins. 2002. 91: 672-680

Hancox JC, Levi AJ, Brooksby P. Intracellular calcium transients recorded with Fura-2 in spontaneously active myocytes isolated from the atrioventricular node of the rabbit heart. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 1994. 255: 99-105

Hegemann P, Nagel G. From channelrhodopsins to optogenetics. *EMBO Molecular Medicine*. 2013. 5: 173-176

Hescheler J, Fleischmann BK, Lentini S, Maltsev VA, Rohwedel J, Wobus AM, Addicks K. Embryonic stem cells: a model to study structural and functional properties in cardiomyogenesis. *Cardiovascular Research*. 1997. 36: 149-162

Hockberger PE, Skimina TA, Centonze VE, Lavin C, Chu S, Dadras S, Reddy, JK, White JG. Activation of flavin-containing oxidases underlies light-induced production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999. 96: 6255-6260

Irie M, Tsuneoka Y, Shimobayashi M, Hasegawa N, Tanaka Y, Mochizuki S, Ichige S, Hamaguchi S, Namekata I, Tanaka H. Involvement of alpha- and beta-adrenoceptors in

the automaticity of the isolated guinea pig pulmonary vein myocardium. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2017. 133: 247-253

Kane MA, Chen N, Sparks S, Napoli JL. Quantification of endogenous retinoic acid in limited biological samples by LC/MS/MS. *Biochemical Journal*. 2005. 388: 363-369

Katz AM. Evolving concepts of heart failure: cooling furnace, malfunctioning pump, enlarging muscle. Part II: Hypertrophy and dilatation of the failing heart. *Journal of cardiac failure*. 1998. 4: 67-81

Katz B, Minke B. *Drosophila* photoreceptors and signaling mechanisms. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2009. 3

Kirshner H, Aguet F, Sage D, Unser M. 3-D PSF fitting for fluorescence microscopy: implementation and localization application. *Journal of Microscopy*. 2012. 249: 13-25

Klein I, Ojamaa K. Thyroid hormone and the cardiovascular system. *New England Journal of Medicine*. 2001. 344: 501-509

Koch WJ. Genetic and phenotypic targeting of beta-adrenergic signaling in heart failure. *Molecular and cellular biochemistry*. 2004. 263: 5-9

Kuschel M, Karczewski P, Hempel P, Schlegel WP, Krause EG, Bartel S. Ser<sup>16</sup> prevails over Thr<sup>17</sup> phospholamban phosphorylation in the  $\beta$ -adrenergic regulation of cardiac relaxation. *American Journal of Physiology*. 1999. 276

Lechat P, Packer M, Chalon S, Cucherat M, Arab T, Boissel JP. Clinical effects of  $\beta$ -adrenergic blockade in chronic heart failure: A meta-analysis of double-blind, placebo-controlled, randomized trials. *Circulation*. 1998. 98: 1184-1191

Lee J, Natarajan M, Nashine V, Socolich M, Vo T, Russ W, Benkovic S, Ranganathan R. Surface sites for engineering allosteric control in proteins. *Science* 2008. 322: 438-442

Li L, Desantiago J, Chu G, Kranias EG, Bers DM. Phosphorylation of phospholamban and troponin I in beta-adrenergic-induced acceleration of cardiac relaxation. *American Journal of Physiology*. 2000. 278: 769-779

Lip GYH, Tse HF, Lane, DA. Atrial fibrillation. *The Lancet*. 2012. 379: 648-661

Lohse MJ, Andexinger S, Pitcher J, Trukawinski S, Codina J, Faure JP, Caron MG, Lefkowitz RJ. Receptor-specific desensitization with purified proteins. Kinase dependence and receptor specificity of beta-arrestin and arrestin in the beta 2-adrenergic receptor and rhodopsin systems. *The Journal of biological chemistry*. 1992. 267: 8558-8564

Lohse MJ, Engelhardt S, Eschenhagen T. What Is the Role of  $\beta$ -Adrenergic Signaling in Heart Failure?. *Circulation Research*. 2003. 93: 896-906

Lohse MJ, Lefkowitz RJ, Caron MG, Benovic JL. Inhibition of  $\beta$ -adrenergic receptor kinase prevents rapid homologous desensitization of  $\beta$ 2-adrenergic receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1989. 86: 3011-3015

Lompré, AM, Hajjar RJ, Harding SE, Kranias EG, Lohse MJ, Marks AR. Ca<sup>2+</sup> Cycling and New Therapeutic Approaches for Heart failure. *Circulation*. 2010. 121: 822-830

Losi A, Christie J, Zoltowski BD, Pudasaini A, El-Arab KK. LOV-based optogenetic devices: light-driven modules to impart photoregulated control of cellular signaling. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2015. 2

Luttrell LM, Lefkowitz RJ. The role of  $\beta$ -arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *Journal of Cell Science*. 2002. 115: 455-465

Madamanchi A.  $\beta$ -Adrenergic receptor signaling in cardiac function and heart failure. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 1999. 39: 343-360

Madyoon H, Maislos F, Mann D, Maurice GL, Nisar A, Old W, Pappas JD, Phadke K, Promisloff S, Rashkow AM, Reeves B, Rosen JH, Rotman M, Saleem T, Savran SV, Shah R, Shalev Y, Shanes J. G, O'Shaughnessy M, Silverman B, Steingart RM, Swenson L, Syed K, Thadani U, Thorsen RD, Tonkon MJ, Touchon R, Uhl G, Vaska KJ, Wagner SG, Weaver CJ, Weiss RJ, Wickemeyer WJ, Willens HJ, Wilson JR, Wright R, Yellen L. Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: Metoprolol CR/XL Randomised Intervention Trial in Congestive Heart Failure (MERIT-HF). *Lancet*. 1999. 353: 2001-2007



Mahmoudi P, Veladi H, Pakdel FG. Optogenetics, Tools and Applications in Neurobiology. *Journal of Medical Signals and Sensors*. 2017. 7: 71-79

Nagel G, Ollig D, Fuhrmann M, Kateriya S, Musti AM, Bamberg E, Hegemann P. Channelrhodopsin-1: A light-gated proton channel in green algae. *Science*. 2002. 296: 2395-2398

Nagel G, Szellas T, Huhn W, Kateriya S, Adeishvili N, Berthold P, Ollig D, Hegemann P, Bamberg E. Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003. 100: 13940-13945

Najafi A, Van De Locht M, Schuldt M, Schönleitner P, Van Willigenburg M, Bollen I, Goebel M, Ottenheijm CAC, Van Der Velden J, Helmes M, Kuster DWD. End-diastolic force pre-activates cardiomyocytes and determines contractile force: role of titin and calcium. *The Journal of Physiology*. 2019. 597: 4521-4531

Ouyang F, Ma J, Ho SY, Bänsch D, Schmidt B, Ernst S, Kuck KH, Liu S, Huang H, Chen M, Chun J, Xia Y, Satomi K, Chu H, Zhang S, Antz M. Focal Atrial Tachycardia Originating From the Non-Coronary Aortic Sinus. Electrophysiological Characteristics and Catheter Ablation. *Journal of the American College of Cardiology*. 2006. 48: 122-131

Packer M, Colucci WS, Sackner-Bernstein JD, Liang CS, Goldscher DA, Freeman I, Kukin ML, Kinhal V, Udelson JE, Klapholz M, Gottlieb SS, Pearle, D, Cody RJ, Gregory JJ, Kantrowitz, NE, LeJemtel TH, Young ST, Lukas MA, Shusterman NH. Double-blind, placebo-controlled study of the effects of carvedilol in patients with moderate to severe heart failure: The PRECISE Trial. *Circulation*. 1996. 94: 2793-2799

Patterson E, Po SS, Scherlag BJ, Lazzara R. Triggered firing in pulmonary veins initiated by in vitro autonomic nerve stimulation. *Heart Rhythm*. 2005. 2: 624-631

Patterson S, Starling E. On the mechanical factors which determine the output of the ventricels. 1914. 48: 357-379

Pavoine C, Defer N. The cardiac  $\beta$ 2-adrenergic signalling a new role for the cPLA2. *Cellular Signalling*. 2005. 17: 141-152

Perry S J, Lefkowitz RJ. Arresting developments in heptahelical receptor signaling and regulation. *Trends in Cell Biology*. 2002. 12: 130-138

Pippig S, Andexinger S, Daniel K, Puzicha M, Caron MG, Lefkowitz RJ, Lohse MJ. Overexpression of beta-arrestin and beta-adrenergic receptor kinase augment desensitization of beta 2-adrenergic receptors. *The Journal of biological chemistry*. 1993. 268: 3201-3208

Prando V, Da Broi F, Franzoso M, Plazzo AP, Pianca N, Francolini M, Basso C, Kay MW, Zaglia T, Mongillo M. Dynamics of neuroeffector coupling at cardiac sympathetic synapses. *The Journal of Physiology*. 2018. 596: 2055-2075

Pudasaini A, El-Arab KK, Zoltowski BD. LOV-based optogenetic devices: Light-driven modules to impart photoregulated control of cellular signaling. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2015. 2

Remington SJ. Fluorescent proteins: maturation, photochemistry and photophysics. *Current Opinion in Structural Biology*. 2006. 16: 714-721

Repina NA, Rosenbloom A, Mukherjee A, Schaffer DV, Kane RS. At Light Speed: Advances in Optogenetic Systems for Regulating Cell Signaling and Behavior. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*. 2017. 8: 13-39

Richter W, Day P, Agrawal R, Bruss MD, Granier S, Wang YL, Rasmussen SG, Horner K, Wang P, Lei T, Patterson AJ, Kobilka B, Conti M. Signaling from beta1- and beta2-adrenergic receptors is defined by differential interactions with PDE4. *The European Molecular Biology Organization (EMBO) Journal*. 2008. 27: 384-393

Rockman HA, Koch WJ, Lefkowitz RJ. Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. *Nature*. 2002. 415: 206-212

Rost BR, Schneider-Warme F, Schmitz D, Hegemann P. Optogenetic Tools for Subcellular Applications in Neuroscience. *Neuron*. 2017. 96: 572-603

Sage D, Donati L, Soulez F, Fortun D, Schmit G, Seitz A, Guiet R, Vonesch C, Unser M. Deconvolution Lab2: An open-source software for deconvolution microscopy. *Methods*. 2017. 115: 28-41

Sasse P, Funken M, Beiert T, Bruegmann T. Optogenetic termination of cardiac arrhythmia: Mechanistic enlightenment and therapeutic application?. *Frontiers in Physiology*. 2019. 10

Sprenger JU, Perera RK, Steinbrecher JH, Lehnart SE, Maier LS, Hasenfuss G, Nikolaev VO. In vivo model with targeted cAMP biosensor reveals changes in receptor-microdomain communication in cardiac disease. *Nature Communications*. 2015. 6

Steinbeck JA, Joon Choi S, Mrejeru A, Ganat Y, Deisseroth K, Sulzer D, Mosharov EV, Studer L, Biotechnol N. Optogenetics enables functional analysis of human embryonic stem cell-derived grafts in a Parkinson's disease model HHS Public Access Author manuscript. *Nature Biotechnology* 2015. 33: 204-209

Stierl M, Stumpf P, Udvari D, Gueta R, Hagedorn R, Losi A, Gä W, Petereit L, Efetova M, Schwarzel M, Oertner TG, Nagel G, Hegemann P. Light Modulation of Cellular cAMP by a Small Bacterial Photoactivated Adenylyl Cyclase, bPAC, of the Soil Bacterium *Beggiatoa*. *Journal of Biological Chemistry*. 2011.286: 1181-1188

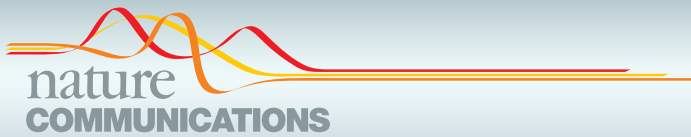
Tohyama S, Hattori F, Sano M, Hishiki T, Nagahata Y, Matsuura T, Hashimoto H, Suzuki T, Yamashita H, Satoh Y, Egashira T, Seki T, Muraoka N, Yamakawa H, Ohgino Y, Tanaka T, Yoichi M, Yuasa S, Murata M, Suematsu M, Fukuda K. Cell Stem Cell Resource Distinct Metabolic Flow Enables Large-Scale Purification of Mouse and Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Stem Cell*. 2013: 127-137

Tønnesen J, Sørensen AT, Deisseroth K, Lundberg C, Kokaia M. Optogenetic control of epileptiform activity. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America (PNAS)*. 2009. 106: 12162-12167

van Weerd JH, Christoffels VM. The formation and function of the cardiac conduction system. *Development (Cambridge)*. 2016. 143: 197-210

- Wagner S, Maier LS, Bers DM. Role of Sodium and Calcium Dysregulation in Tachyarrhythmias in Sudden Cardiac Death. *Circulation Research*. 2015. 116: 1956-1970
- Wainger BJ, Degennaro M, Santoro B, Siegelbaum SA, Tibbs GR. Molecular mechanism of cAMP modulation of HCN pacemaker channels. *Nature*. 2001. 411: 805-810
- Wengrowski AM, Wang X, Tapa S, Gillum Posnack N, Mendelowitz D, Kay MW. Optogenetic release of norepinephrine from cardiac sympathetic neurons alters mechanical and electrical function. *Cardiovascular Research*. 2015. 105: 143-150
- Yamamoto K, Tanei ZI, Deisseroth K, Correspondence TI, Hashimoto T, Wakabayashi T, Okuno H, Naka Y, Yizhar O, Fenno LE, Fukayama M, Bito H, Cirrito JR, Holtzman DM, Iwatsubo T. Chronic Optogenetic Activation Augments Ab Pathology in a Mouse Model of Alzheimer Disease. *Cell Resports*. 2015. 11 859-865
- Zhu WZ, Wang SQ, Chakir K, Yang D, Zhang T, Brown JH, Devic E, Kobilka BK, Cheng H, Xiao R. Linkage of beta1-adrenergic stimulation to apoptotic heart cell death through protein kinase A-independent activation of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin kinase II. *The Journal of Clinical Investiation*. 2003. 111: 617-625

## 2. Veröffentlichung



### ARTICLE

<https://doi.org/10.1038/s41467-019-09322-7>

OPEN

# Optogenetic stimulation of $G_s$ -signaling in the heart with high spatio-temporal precision

Philipp Makowka<sup>1</sup>, Tobias Bruegmann<sup>1,2,4</sup>, Vanessa Dusend<sup>1,2</sup>, Daniela Malan<sup>1</sup>, Thomas Beiert<sup>3</sup>, Michael Hesse<sup>1</sup>, Bernd K. Fleischmann<sup>1</sup> & Philipp Sasse<sup>1</sup>

The standard technique for investigating adrenergic effects on heart function is perfusion with pharmaceutical agonists, which does not provide high temporal or spatial precision. Herein we demonstrate that the light sensitive  $G_s$ -protein coupled receptor JellyOp enables optogenetic stimulation of  $G_s$ -signaling in cardiomyocytes and the whole heart. Illumination of transgenic embryonic stem cell-derived cardiomyocytes or of the right atrium of mice expressing JellyOp elevates cAMP levels and instantaneously accelerates spontaneous beating rates similar to pharmacological  $\beta$ -adrenergic stimulation. Light application to the dorsal left atrium instead leads to supraventricular extrabeats, indicating adverse effects of localized  $G_s$ -signaling. In isolated ventricular cardiomyocytes from JellyOp mice, we find increased  $Ca^{2+}$  currents, fractional cell shortening and relaxation rates after illumination enabling the analysis of differential  $G_s$ -signaling with high temporal precision. Thus, JellyOp expression allows localized and time-restricted  $G_s$  stimulation and will provide mechanistic insights into different effects of site-specific, long-lasting and pulsatile  $G_s$  activation.

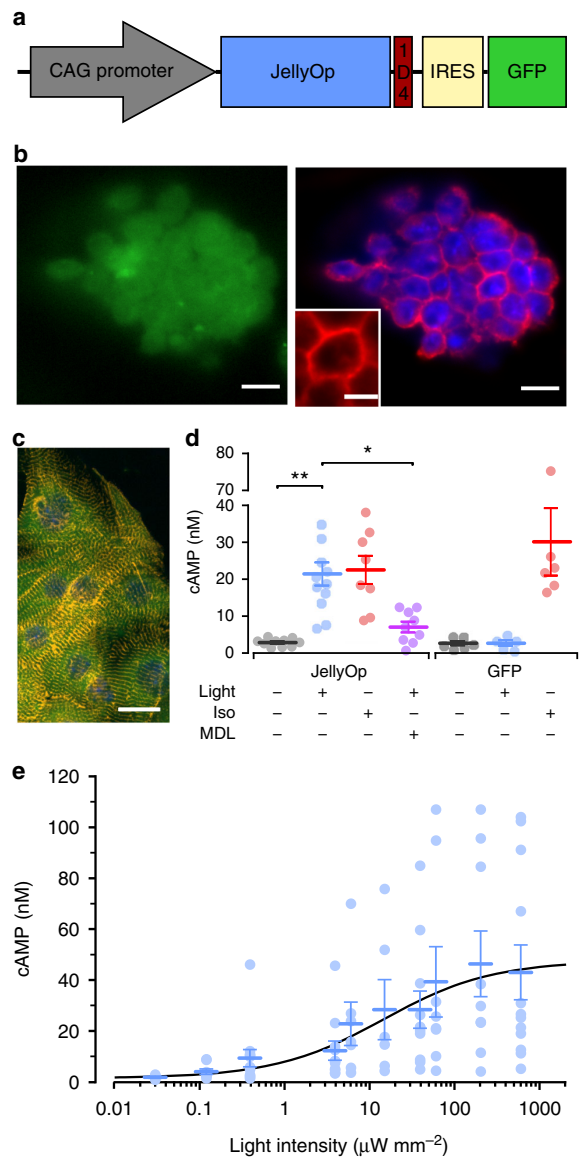
<sup>1</sup>Institute of Physiology I, Medical Faculty, University of Bonn, 53127 Bonn, Germany. <sup>2</sup>Research Training Group 1873, University of Bonn, 53127 Bonn, Germany. <sup>3</sup>Department of Internal Medicine II, University Hospital Bonn, University of Bonn, 53127 Bonn, Germany. <sup>4</sup>Present address: Institute of Cardiovascular Physiology, University Medical Center, 37077 Göttingen, Germany. These authors contributed equally: Philipp Makowka, Tobias Bruegmann, Vanessa Dusend. Correspondence and requests for materials should be addressed to P.S. (email: [philipp.sasse@uni-bonn.de](mailto:philipp.sasse@uni-bonn.de))

Neuronal and humoral stimulation of  $\beta$ -adrenergic receptors activates  $G_s$ -proteins in cardiomyocytes in order to adapt heart function to increased oxygen demand of the body. The key signaling pathway is activation of adenylyl cyclases by the  $G_\alpha$ -subunit of the heterotrimeric  $G_s$ -protein leading to increased production of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) which in turn stimulates the protein kinase A to phosphorylate target proteins<sup>1–3</sup>. This pathway leads to physiological elevation of the cardiac output by increasing beating rate and stroke volume. In contrast, chronic stimulation of the  $G_s$ -pathway can have detrimental effects by induction of cardiac hypertrophy and heart failure<sup>2–5</sup> as well as by enhancing the propensity for arrhythmia, especially in diseased hearts<sup>2–4,6</sup>. Current technologies to activate G-protein signaling require perfusion with receptor agonists, which inherently lack cell specificity and only provide limited temporal and spatial precision due to slow and uncontrollable diffusion and wash out kinetics<sup>7</sup>. In this report, we characterize in detail the use of the opsin from the lower invertebrate prebilaterian animal Jellyfish *Carybdea rastonii*<sup>8</sup>, shortly termed “JellyOp”, for optogenetic control of the  $G_s$ -signaling cascade in cardiomyocytes *in vitro* and in the intact heart. Importantly, JellyOp was previously shown to selectively activate  $G_s$ -proteins only, without promiscuous effects on  $G_i$ - or  $G_q$ -proteins<sup>9</sup>.

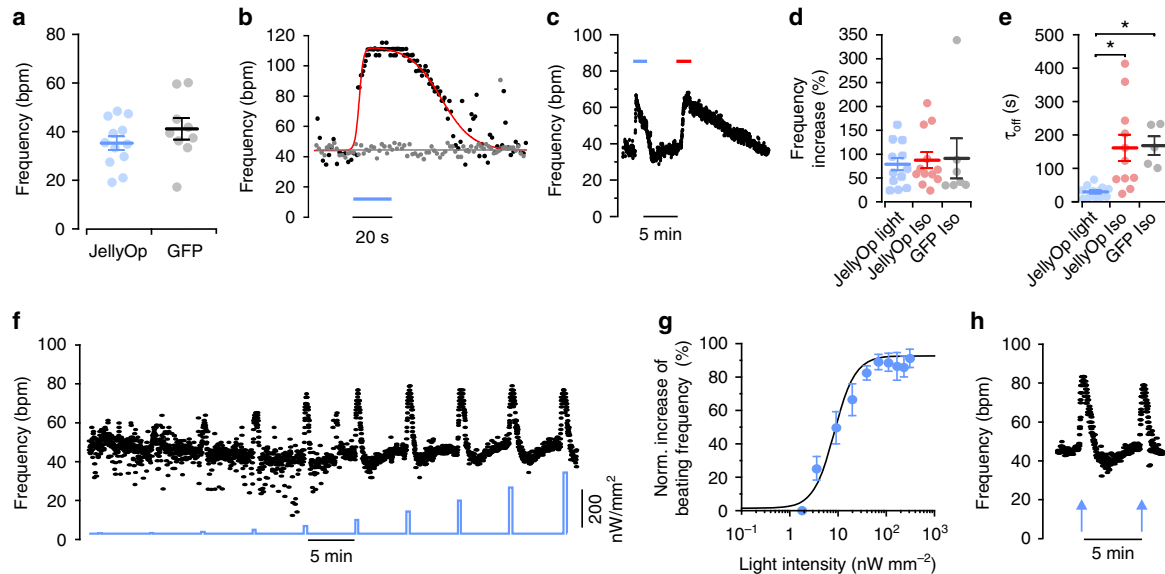
## Results and discussion

**JellyOp activates  $G_s$ -signaling in cardiomyocytes.** JellyOp and GFP were expressed in cardiomyocytes under control of the ubiquitously active chicken  $\beta$ -actin promoter (Fig. 1a) by generation and differentiation of a stable transgenic G4 mouse embryonic stem cell (ESC) line. Transgenic JellyOp ESCs showed cytosolic GFP fluorescence and membrane-bound staining against the 1D4 epitope tag of JellyOp (Fig. 1b). Spontaneously beating embryoid bodies (EBs) generated from JellyOp ESCs contained  $\alpha$ -actinin and GFP positive cardiomyocytes indicating JellyOp expression (Fig. 1c). Stimulation of JellyOp EBs with blue light (470 nm, 2.9 mW mm<sup>-2</sup>, 5 min) led to an increase in cAMP levels to 646% of baseline, which was similar to maximal pharmacological stimulation by the  $\beta$ -adrenergic agonist isoprenaline (Fig. 1d; 1  $\mu$ M, 5 min). This light response was significantly lower after pharmacologically blocking the adenylyl cyclase with MDL-12,330A (Fig. 1d), which is in accordance with Bailes et al. who showed blunted JellyOp effects by  $G_s$  but not by  $G_q$  or  $G_i$  inhibition<sup>9</sup>. Importantly, EBs expressing only GFP under control of the same promoter showed no light response and had identical basal cAMP levels compared to JellyOp EBs kept in the dark (Fig. 1d), excluding side effects or dark activity of JellyOp. Application of light with increasing intensities to purified ESC-derived cardiomyocytes induced a gradual increment of cAMP levels with a sigmoidal relationship on the logarithm of light intensity (Fig. 1e). Although we cannot fully exclude the activation of other G-proteins and intracellular pathways (Arrestin, CaMKII), our results clearly show that optogenetic stimulation with JellyOp enables fine control over cAMP levels in cardiomyocytes.

Spontaneously beating EBs were used to characterize the positive chronotropic response upon light stimulation. Baseline beating frequency in the dark was similar in JellyOp and GFP control EBs (Fig. 2a) suggesting the lack of JellyOp dark activity which would affect basal pacemaker activity. Brief illuminations (309 nW mm<sup>-2</sup>, 20 s) of contracting areas within JellyOp EBs caused an instantaneous increase in beating frequency (Fig. 2b, Supplementary Movie 1), which was not seen in GFP-expressing control EBs. Light stimulation of JellyOp EBs induced an increase in beating rate which was similar to stimulation with isoprenaline



**Fig. 1** Generation of JellyOp expressing mouse ESCs and light-induced cAMP production in cardiomyocytes. **a** Plasmid for expression of JellyOp in fusion with the 1D4 rhodopsin epitope and with an internal ribosome entry site (IRES) for co-expression of the green fluorescence protein (GFP) under control of the chicken  $\beta$ -actin promoter (CAG). **b** Immunostaining of a transgenic ESC colony expressing GFP (green) and JellyOp (red: 1D4 rhodopsin epitope staining) (nuclear staining in blue, bars: 10  $\mu$ m; insert: 5  $\mu$ m). **c** GFP positive (green) cardiomyocytes indicated by  $\alpha$ -actinin (yellow) staining (nuclear staining in blue, bar: 20  $\mu$ m). **d** cAMP levels in JellyOp and GFP EBs after illumination (2.9 mW mm<sup>-2</sup>, 5 min, MDL: 100  $\mu$ M MDL-12,330A) or isoprenaline (Iso, 1  $\mu$ M, 5 min) application ( $n = 5-12$ , Welch ANOVA:  $p = 0.0014$ , Games-Howell post-test:  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ). **e** Relationship between cAMP levels and light intensity in lactate-purified (see Methods) cardiomyocytes fitted with Hill equation ( $n = 5-12$ ). Error bars: S.E.M.



**Fig. 2** JellyOp activates  $G_s$ -signaling in ESC-derived cardiomyocytes. **a** Baseline frequencies of unstimulated spontaneously beating EBs expressing JellyOp ( $n = 12$ ) or GFP only ( $n = 9$ ) (two-sided unpaired Student's  $t$ -test:  $p = 0.2527$ ). **b** Spontaneous beating frequency during illumination (blue bar,  $309 \text{ nW mm}^{-2}$ ) of a JellyOp (black dots, fit in red see Methods) and a GFP control EB (gray). **c** Representative frequency trace of a JellyOp EB during stimulation by light (blue bar,  $309 \text{ nW mm}^{-2}$ ) or with isoprenaline (red bar,  $1 \mu\text{M}$ ). **d**, **e** Statistical analysis of maximal beating rate increase (**d**) and deactivation time constant ( $\tau_{\text{off}}$ ) after termination of stimulation (**e**) using JellyOp and GFP control EBs ( $n = 5$ – $12$ , one-way ANOVA:  $p = 0.924$  (**d**), Welch ANOVA,  $p = 0.003$  (**e**), Games-Howell post-test:  $*p < 0.05$ ). **f** Representative frequency trace of a JellyOp EB during stimulation by light pulses (20 s, 5 min delay) with stepwise increasing light intensities ( $2$ – $309 \text{ nW mm}^{-2}$ ). **g** Relationship between normalized peak frequency increase and light intensity fitted with Hill equation ( $n = 5$ ). **h** Frequency trace upon illumination with two supramaximal light intensities (blue arrows: left  $1770$  and right  $2370 \text{ nW mm}^{-2}$ , 20 s). Error bars: S.E.M.

in JellyOp and GFP control EBs (Fig. 2c, d). In contrast, return to baseline was significantly ( $\sim 5$  times) faster after termination of optogenetic stimulation compared to wash out of isoprenaline (Fig. 2c, e). This suggests that JellyOp expression does neither sensitize nor inhibit the native  $\beta$ -adrenergic signaling cascade and that optogenetic activation of  $G_s$ -signaling has identical effectiveness but higher temporal precision compared to agonist application.

To demonstrate fine graded control of beating rate, we stimulated EBs with light pulses (20 s) of stepwise increasing light intensities (Fig. 2f). This resulted in a gradual increase of beating frequency with a sigmoidal dependency on the logarithm of applied light intensity (Fig. 2g), similar to a dose-response relationship using a receptor agonist. The data points could be fitted with the Hill equation yielding a half maximal effective light intensity (EL<sub>50</sub>) of  $8.4 \text{ nW mm}^{-2}$  and a maximal effect at intensities of  $\sim 100 \text{ nW mm}^{-2}$ . Supramaximal stimulation with up to 10-fold higher light intensities did not enhance the effect nor did it show desensitization, when applied repetitively with 300 s intervals between stimulations (Fig. 2h).

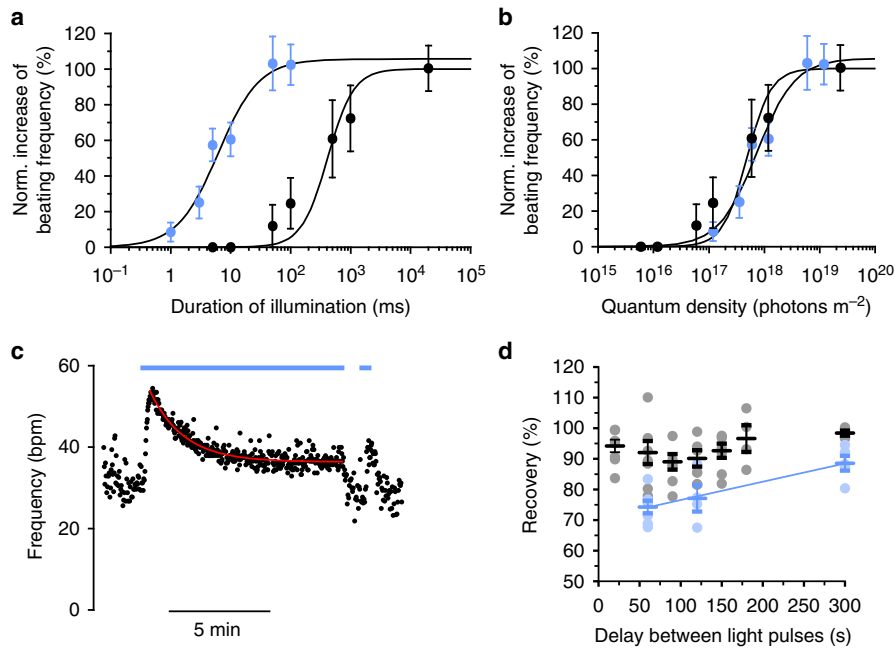
Next, we tested if graded control of  $G_s$ -signaling could be also achieved in EBs by varying the duration of JellyOp stimulation using light pulses between 1 ms and 20 s at two different light intensities, which are both supramaximal at 20 s pulse duration. Again, we observed a sigmoidal dependence of the chronotropic response on the logarithm of pulse duration and the 50% effect was obtained with an exposure time of 6.2 ms or 415 ms using  $30.9 \mu\text{W mm}^{-2}$  or  $0.309 \mu\text{W mm}^{-2}$  light pulses, respectively (Fig. 3a). To quantitatively compare these values, we calculated the amount of applied photons (quantum density) during each light pulse and found almost identical photon response-curves for both light intensities (Fig. 3b). Thus, activation of the  $G_s$ -pathway

with JellyOp is proportional to the product of light intensity and pulse duration and both parameters can be used to titrate the cellular response.

Besides brief light pulses, we also tested the response to prolonged illuminations over 10 min. This induced an instantaneous acceleration of EB beating frequencies to a maximum of  $71.4 \pm 5.3\%$  increase (mean  $\pm$  S.E.M.,  $n = 16$ ) and a subsequent inactivation with decline of chronotropy to a steady state rate ( $19.8 \pm 2.9\%$  increase of baseline frequency) with a time constant of  $93.4 \pm 14.0 \text{ s}$  (Fig. 3c). Interestingly, after 10 min continuous stimulation, the cardiomyocytes had to recover for at least  $\sim 5$  min in order to induce a similar frequency increase ( $>90\%$  of the first stimulation, Fig. 3d, blue dots). In contrast, recovery rate was much faster after 20 s stimulations and  $>90\%$  recovery was reached already after 20 s waiting (Fig. 3d, black dots).

Thus, JellyOp can be used to stimulate  $G_s$ -signaling in cardiomyocytes in vitro repetitively without strong desensitization, when using brief ( $<20 \text{ s}$ ) illuminations. Because short and repetitive stimulations would be technically very challenging or even impossible using receptor agonists, our approach will enable experimental paradigms to explore the differential impact of long-lasting vs. pulsatile  $G_s$ -activation patterns to examine the effects of refractoriness, recovery and desensitization of G-proteins and their downstream effectors.

**Optogenetic  $G_s$ -signaling in cardiomyocytes from JellyOp mice.** To analyze JellyOp function in the intact heart, we generated a transgenic JellyOp mouse line from the JellyOp G4 ESCs, which showed bright GFP expression in the atria and ventricles of the heart (Fig. 4a). Histological sections of the heart showed cytosolic GFP expression and membrane-bound JellyOp signal in



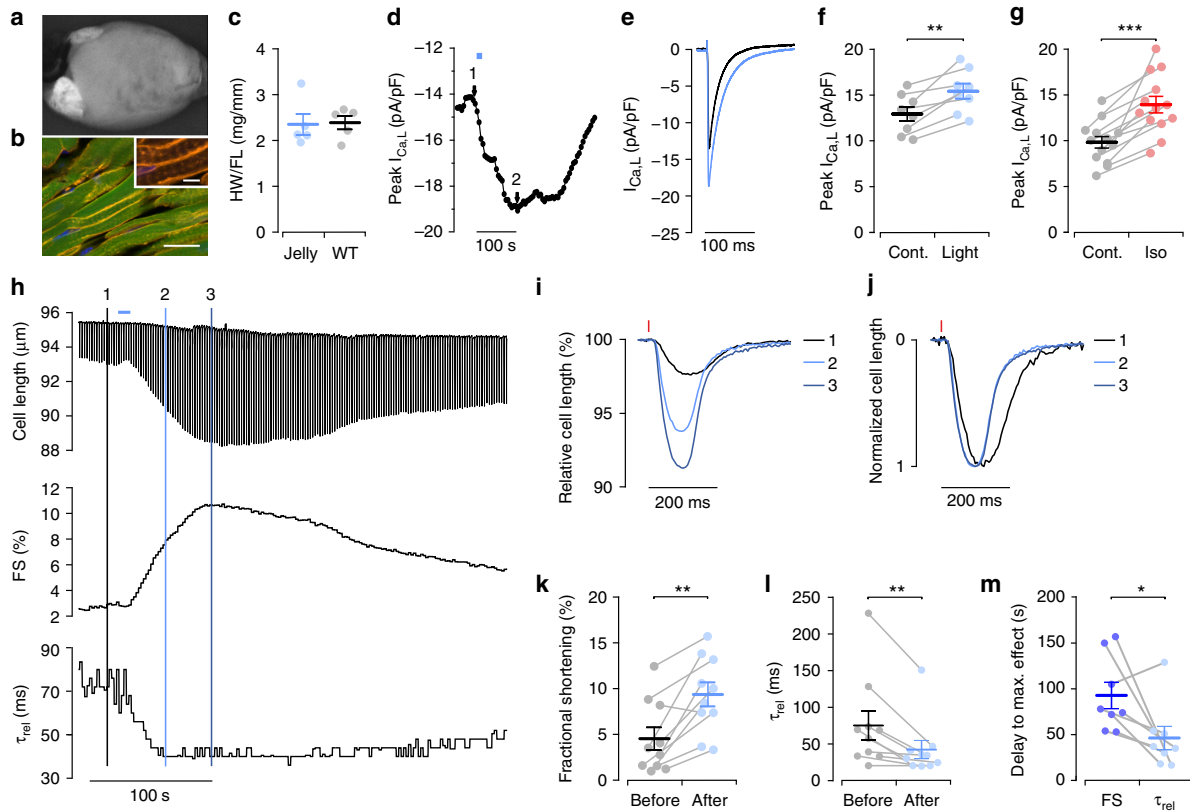
**Fig. 3** Analysis of JellyOp light sensitivity and recovery in ESC-derived cardiomyocytes in vitro. **a, b** Relationship between normalized peak frequency increase and duration of light pulses (**a**) or applied photon-density (**b**) for light pulses with 30.9 (blue dots) and 0.309 (black dots)  $\mu\text{W mm}^{-2}$  ( $n = 6$ ). **c** Representative frequency trace with long illumination (blue bar, 309  $\text{nW mm}^{-2}$ , 10 min, inactivation fit in red) and a subsequent second light pulse (20 s). **d** Percentage of recovery of frequency response after a short (20 s, black dots) or a long-lasting (10 min, blue dots) illumination (309  $\text{nW mm}^{-2}$ ) analyzed with a second light pulse at various delay after the first light pulse. Error bars: S.E.M.

all ventricular cardiomyocytes (Fig. 4b). It is well known that chronic  $\beta$ -adrenergic stimulation of the heart causes alterations in  $\text{Ca}^{2+}$ -handling and cardiac hypertrophy with subsequent heart failure<sup>10,11</sup>. JellyOp mice were viable and did not show any obvious phenotype. To exclude possible hypertrophic side effects, we determined the heart weight to femur length ratio and could not detect a difference between JellyOp and wild-type mice (Fig. 4c). Ventricular cardiomyocytes were dissociated and investigated using patch-clamp and contraction measurements. Illumination with blue light (100  $\mu\text{W mm}^{-2}$ , 10 s) resulted in an instantaneous increase of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current ( $I_{\text{Ca,L}}$ ), which reached a maximal increase of  $20.5 \pm 5.4\%$  within  $63.8 \pm 7.9$  s after the start of illumination (Fig. 4d–f). This response was smaller compared to the effect of  $\beta$ -adrenergic stimulation with isoprenaline (1  $\mu\text{M}$ ) that led to an  $I_{\text{Ca,L}}$  increase of  $43.3 \pm 6.7\%$  (Fig. 4g). Contractility and relaxation speed were analyzed by edge detection of isolated, electrically paced ventricular cardiomyocytes. Similarly to the effects on  $I_{\text{Ca,L}}$ , illumination (100  $\mu\text{W mm}^{-2}$ , 10 s) led to an instantaneous enhancement of the degree of contraction with a maximal increase of  $218 \pm 70\%$  and faster relaxation with a reduction of time constant  $\tau_{\text{rel}}$  by  $38.6 \pm 6.5\%$  (Fig. 4h–l). The smaller stimulatory effect on  $I_{\text{Ca,L}}$  (+21%) compared to the effect on contractility (+218%) is most likely due to the fact that cAMP-dependent PKA phosphorylates, besides the L-type  $\text{Ca}^{2+}$ -channels, also other target proteins involved in the regulation of contractile force, such as the ryanodine-receptor type 2 and phospholamban and thereby augments function of the sarco/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, which altogether increases the  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release mechanism. Interestingly, maximal relaxation speed was reached  $46.3 \pm 12.7$  s after the onset of illumination, which was significantly faster than the maximal effect on contraction, which was observed after  $92.9 \pm 14.4$  s (Fig. 4m). This might indicate privileged phosphorylation

of the phospholamban microdomain compared to bulk cytosolic phosphorylation of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels and ryanodine-receptors, as reported earlier<sup>12</sup>. Interestingly, the fast effect on relaxation speed after  $\beta$ -adrenergic stimulation is well in line with previously reported phospholamban phosphorylation data obtained from isolated ventricular mouse cardiomyocytes<sup>13</sup> or freeze clamped rat hearts<sup>14</sup>.

**Spatial difference in  $G_s$ -signaling in the atria.** To modulate chronotropy of the heart, we investigated the atria of JellyOp mice and found bright GFP fluorescence and membrane-bound JellyOp signals in atrial cardiomyocytes (Fig. 5a). Illumination (2.9  $\text{mW mm}^{-2}$ , 5 min) of isolated atrial tissue significantly increased cAMP levels by 224%, which was similar to the application of 1  $\mu\text{M}$  isoprenaline (Fig. 5b). The ability of JellyOp to modulate the beating rate was analyzed in explanted, Langendorff-perfused hearts. Supramaximal illumination (2  $\text{mW mm}^{-2}$ , 90 s) of the right atrium, in which the sinus node is located, led to a maximal acceleration of heart rate by  $44.0 \pm 4.1\%$  (Fig. 5c, e). After reaching the peak frequency, hearts showed a clear reduction of the chronotropic response during illumination with a time constant of  $33.5 \pm 18.1$  s to a steady state level of  $28.8 \pm 8.5\%$  ( $n = 5$ ) heart rate acceleration. This time course and the decline to a steady state level of 65% of the peak effect is very similar to that of cAMP levels in isolated ventricular mouse cardiomyocytes during continuous isoprenaline stimulation<sup>15</sup> and was explained in a mathematical model of  $\beta$ -adrenergic signaling by phosphodiesterase activity, cAMP fluxes between compartments, and receptor desensitization<sup>16</sup>. Compared to illumination, pharmacological stimulation with 1  $\mu\text{M}$  isoprenaline resulted in slightly higher maximal heart rates (Fig. 5d, e), but only after much longer stimulation duration (Fig. 5d, f). Importantly, the chronotropic effect returned almost instantaneously to baseline after termination of





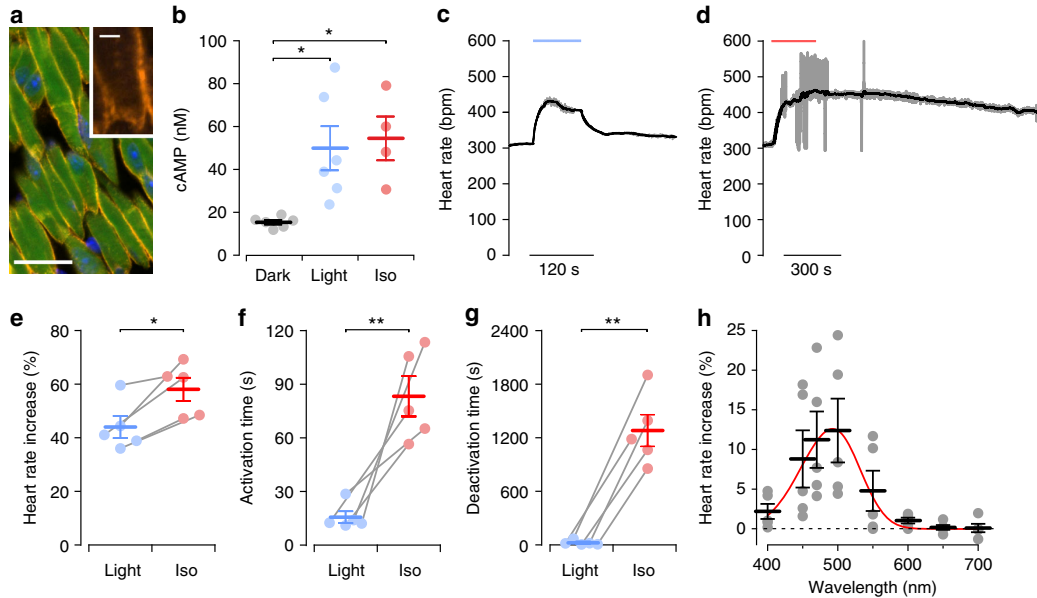
**Fig. 4** JellyOp function in isolated mouse ventricular cardiomyocytes. **a** Overview of GFP fluorescence in an intact JellyOp mouse heart. **b** Section of the left ventricle with membrane-bound JellyOp-1D4 epitope signals (yellow) in GFP (green) positive cardiomyocytes (nuclear staining in blue, bar: 20  $\mu\text{m}$ , insert: 5  $\mu\text{m}$ ). **c** Heart weight (HW) to femur length (FL) ratio in JellyOp (Jelly) and wild-type (WT) mice (>6 months of age,  $n = 5$ , two-sided unpaired Student's  $t$ -test:  $p = 0.8915$ ). **d, e** Representative changes in peak L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current ( $I_{\text{Ca,L}}$ ) in a JellyOp ventricular cardiomyocyte upon illumination (**d**, blue bar,  $100 \mu\text{W mm}^{-2}$ , 10 s) and original traces taken from time points indicated (**e**). **f, g** Statistical analysis of maximal  $I_{\text{Ca,L}}$  before (Contr., black) and after illumination (**f**, blue,  $100 \mu\text{W mm}^{-2}$ , 10 s,  $n = 8$ , two-sided paired Student's  $t$ -test:  $p = 0.0035$ ) or isoprenaline application (**g**, red,  $1 \mu\text{M}$ , 75–100 s,  $n = 13$ , two-sided paired Student's  $t$ -test:  $p = 0.00003$ ). **h** Original trace (upper panel) of cell length measurement from an electrically stimulated isolated JellyOp ventricular cardiomyocyte upon illumination (blue bar,  $100 \mu\text{W mm}^{-2}$ , 10 s) with corresponding fractional shortening (FS, middle panel) and relaxation constant  $\tau_{\text{rel}}$  (lower panel). **i, j** Single traces of relative cell length in % of resting length (**i**) and normalized to maximal shortening (**j**) evoked by electrical stimulation (red line) before (1, black), 40 s (2, light blue) and 80 s (3, dark blue) after illumination (time points indicated in **h**). **k, l** Statistical analysis of maximal fractional shortening (**k**) and relaxation speed ( $\tau_{\text{rel}}$ , **l**) before (black) and after (blue) illumination ( $100 \mu\text{W mm}^{-2}$ , 10 s,  $n = 10$ , two-sided paired Student's  $t$ -test,  $p = 0.0011$  (**k**); Wilcoxon signed rank test,  $p = 0.004$  (**l**)). **m** Delay from illumination onset to maximal effect on fractional cell shortening (FS, dark blue) and relaxation speed ( $\tau_{\text{rel}}$ , light blue) ( $n = 8$ , Wilcoxon signed rank test,  $p = 0.04$ ). Error bars: S.E.M.

illumination in contrast to a sustained effect after wash out of isoprenaline (Fig. 5g). The spectral sensitivity of JellyOp was tested by illuminating the right atrium with monochromatic light between 400 and 700 nm, which resulted in a frequency increase between 400 and 600 nm (Fig. 5h). These data were fitted with the template of an opsin retinaldehyde pigment (Govardovskii nomogram)<sup>17</sup> resulting in a peak wavelength ( $\lambda_{\text{max}}$ ) of 493 nm (Fig. 5h, red line), which is in accordance with the reported action spectrum of wild-type JellyOp<sup>18</sup>. This data and the fit (Eq. (2), see Methods) can be used to estimate the required light intensity at less optimal wavelengths, e.g., to obtain the effect of 493 nm ( $10 \mu\text{W mm}^{-2}$ )  $\sim 800 \mu\text{W mm}^{-2}$  would be required at 600 nm. However, we would like to point out that light penetration into the tissue surrounding the sinus node is wavelength dependent and light can be toxic at high intensities (e.g., calculated  $51 \text{ mW mm}^{-2}$  at 650 nm is unrealistic).

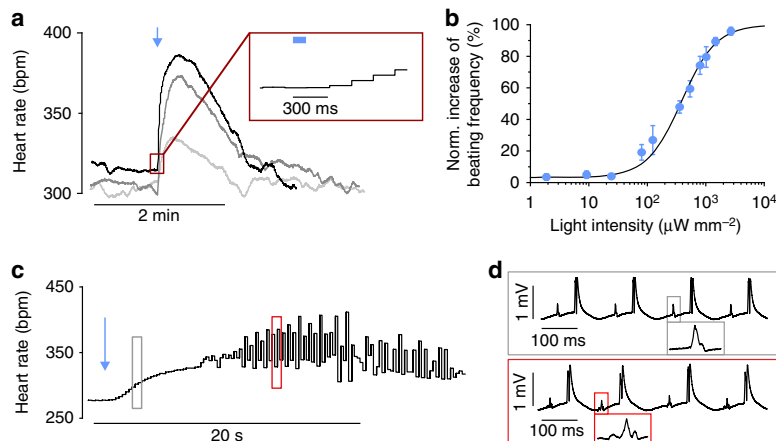
To analyze the delay of  $G_s$ -induced heart rate modulation, we applied very brief light pulses ( $1 \text{ mW mm}^{-2}$ , 100 ms) to the

right atrium. This led to an almost instantaneous acceleration of the spontaneous sinus rhythm by 14.2% starting already  $\sim 300$  ms after the onset of illumination (Fig. 6a) and reaching a maximum frequency after  $17.8 \pm 3.3$  s ( $n = 7$ ). Application of light pulses (100 ms) with various intensities resulted in an ELi50 for light-induced heart rate increase of  $386 \mu\text{W mm}^{-2}$  (Fig. 6b). The 5-fold difference in temporal kinetics of sinus rate acceleration (peak in <20 s) compared to the PKA effects in isolated ventricular cells (peak in  $\sim 100$  s) is most likely caused by the direct action of cAMP on the pacemaker HCN-channels in sinus node cells<sup>19</sup>. Importantly, the very short delay from light to rate response correlates well with recent reports using optogenetic stimulation of cardiac sympathetic neurons<sup>20,21</sup>.

It is known that atrial premature contractions inducing atrial fibrillation are often originating from the ostia of pulmonary veins in the dorsal left atrium<sup>22,23</sup>. To prove that localized  $\beta$ -adrenergic effects can be investigated using our optogenetic method, we applied light pulses to the dorsal



**Fig. 5** JellyOp function in mouse atria of intact hearts. **a** Section through the right atrium shows GFP (green) and membrane-bound JellyOp-1D4 epitope signals (yellow, nuclear staining in blue, bar: 20  $\mu\text{m}$ , insert: 5  $\mu\text{m}$ ). **b** Analysis of cAMP levels in atrial tissue from JellyOp mice in the dark and after illumination (2.86  $\mu\text{W mm}^{-2}$ , 5 min) or stimulation with isoprenaline (Iso, 1  $\mu\text{M}$ , 5 min) ( $n = 4-6$ , one-way ANOVA:  $p = 0.0074$ , Bonferroni post-test:  $*p < 0.05$ ). **c, d** Representative heart rate traces of a JellyOp heart during maximal light stimulation of the dorsal right atrium (**c**, blue bar, 2  $\text{mW mm}^{-2}$ , 90 s) or during perfusion with isoprenaline (**d**, red bar; 1  $\mu\text{M}$ , 4 min) (gray: original trace, black: running average values). **e-g** Statistical analysis of the maximal relative heart rate increase (**e**), activation time (**f**, stimulation start to 80% of maximum rate), and deactivation time (**g**, stimulation end to 50% of maximum rate) after illumination (blue, 2  $\text{mW mm}^{-2}$ , 90 s) and perfusion with isoprenaline (red, 1  $\mu\text{M}$ , 4 min) ( $n = 5$ , two-sided paired Student's *t*-test:  $p = 0.0248$  (**e**),  $p = 0.0058$  (**f**),  $p = 0.0017$  (**g**)). **h** Relative heart rate increase after illumination of the dorsal right atrium with light of wavelengths of 470 nm and 400–700 nm in 50 nm steps (10  $\mu\text{W mm}^{-2}$ , 1 s,  $n = 5$ ) fitted with the Govardovskii equation (red line,  $R^2 = 0.98$ ). Error bars: S.E.M.



**Fig. 6** Spatial difference of JellyOp stimulation in the left and right atria. **a** Representative heart rate traces upon brief (blue arrow, 100 ms) illumination of the anterior right atrium with 80 (gray), 540 (dark gray), and 1015 (black)  $\mu\text{W mm}^{-2}$ . Insert (red box) highlights the short delay between light (blue bar) and start of heart rate acceleration. **b** Statistical analysis of experiments described in (**a**) showing the relationship between normalized peak heart rate increase and light intensity fitted with Hill equation ( $n = 7$ ). **c** Representative heart rate trace upon illumination of the dorsal left atrium (blue arrow, 190  $\mu\text{W mm}^{-2}$ , 1 s) resulting in irregular beating. **d** ECG traces from the experiment shown in (**c**) before (gray box) and during a period with premature atrial contractions (red box) indicated by altered *P*-wave morphology (see inserts). Error bars: S.E.M.

left atrium (190  $\mu\text{W mm}^{-2}$ , 1 s). This initially induced a mild acceleration of sinus rhythm (possibly due to scattered light to the sinus node), which was subsequently interposed by spontaneous premature atrial contractions (Fig. 6c). These were characterized by premature *P*-waves with different morphology compared to

regular sinus rhythm (Fig. 6d) indicating an origin outside the sinus node, most likely from the illuminated region. Importantly, we have not observed such premature atrial contractions when flashing light with identical parameters on the right atrium of JellyOp mice.

Because of the lack of cell-type specific expression of JellyOp, definitive conclusions on the mechanism and the cell types involved in the observed supraventricular arrhythmia cannot be drawn at this stage. In the future, cell-type specific expression of JellyOp using Cre/LoxP systems in cardiomyocytes, fibroblasts, endothelial- and smooth muscle cells will allow the analysis of direct and paracrine effects of  $\beta$ -adrenergic signaling in the different cell types of the heart.

Taken together, we herein present JellyOp as an optogenetic tool to investigate  $G_s$ -signaling in the heart. The precise spatial and temporal control allows novel stimulation protocols to determine the physiological and pathophysiological effects of  $G_s$ -activation for pacemaker function and arrhythmia generation in the intact heart. As a proof-of-concept, we have investigated the precise temporal delay between activation of the receptor and downstream effects on pacemaker activity and contractility in vitro as well as in the intact heart and demonstrated spatial differences of  $G_s$ -signaling in the left and right atria. Importantly, we could not detect any side effects on the heart by overexpressing JellyOp indicating a lack of adverse dark activity.

When comparing JellyOp stimulation to pharmacological stimulation of  $\beta$ -receptors with isoprenaline, similar effects on beating rate increase of ESC-derived cardiomyocytes were observed (light: 79%, isoprenaline: 87%, Fig. 2d), but the effect of light was significantly lower on  $I_{Ca,L}$  in ventricular cardiomyocytes (light: 21%, isoprenaline: 43%) or heart rate of sinus node cells in the intact heart (light: 44%, isoprenaline: 58%, Fig. 5e). At this stage, we cannot exclude that JellyOp slightly also activates  $G_i$ -proteins, and thereby impairs the  $G_s$  effect. However, this could also be explained by privileged signaling of  $\beta$ -receptors to the  $G_s$ -proteins and adenylate cyclases in microdomains compared to an overexpressed receptor from the lower invertebrate prebilaterian animal Jellyfish. Targeting JellyOp to specific compartments by transplanting arrestin or phosphodiesterase interacting protein sequences<sup>24</sup> from  $\beta_1$  or  $\beta_2$ -receptors to JellyOp will be a very powerful tool to determine the influence of macromolecular signaling complexes on  $\beta$ -adrenergic signaling with high temporal resolution.

In general, direct optogenetic stimulation of G-protein coupled receptors will provide new insights into temporal and spatial aspects of G-protein and downstream signaling, and the consequences for cardiovascular (patho-)physiology.

## Methods

**Generation of the JellyOp IRES GFP construct.** The CAG-JellyOp-IRES-GFP expression vector was designed by excising the JellyOp-1D4 epitope fragment from the 1256pcDNA3.1-JellyOp plasmid (kindly provided by R. Lucas, University of Manchester) by XhoI and SacI and cloning it into the CAG-mOPN4-IRES-GFP vector<sup>7</sup> from which mOPN4 had been removed by BamHI/SacI excision. The plasmid was confirmed by sequencing and linearized with BglII before transfection.

**ESC culture, transfection, and differentiation.** G4 hybrid ESCs (mycoplasma negative, kindly provided by A. Nagy and M. Gertsenstein, Mount Sinai Hospital, Toronto) were cultured on neomycin-resistant mouse embryonic fibroblasts in high-glucose Dulbecco's Modified Eagle's Medium (KnockOut DMEM, Invitrogen) supplemented with 15% FCS (PAN-Biotech), 0.1 mM nonessential amino acids, 100 U mL<sup>-1</sup> penicillin, 100 mg mL<sup>-1</sup> streptomycin, 2 mg mL<sup>-1</sup> L-glutamine (all Invitrogen), 0.1 mM  $\beta$ -mercaptoethanol (Sigma-Aldrich), and 500 U mL<sup>-1</sup> leukemia inhibitory factor (Chemicon). DNA transfection was performed by electroporation of  $4 \times 10^6$  ES cells in PBS (Invitrogen) mixed with 40  $\mu$ g of the linearized CAG-JellyOp-IRES-GFP plasmid with a single electrical pulse (250 V, 500  $\mu$ F, Bio-Rad Gene Pulser)<sup>7,25</sup>. Electroporated ESCs were plated and 24 h after transfection, 165  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> G418 was added to the medium to select for neomycin-resistant colonies. GFP positive clones were picked and further propagated. ESCs with stable expression of GFP under control of the CAG promoter served as controls<sup>7,25</sup>. During ESC culture, 9-Cis retinal was not supplemented. ESCs were differentiated within EBs using the hanging drop method (20,000 cells per drop)<sup>7,25</sup>. After 2 days, hanging drops were washed and kept in suspension on a horizontal shaker for 3 days. At day 5 of differentiation, EBs were either plated on 0.1% gelatin-coated

glass coverslips for analysis of beating frequency and cAMP concentrations or used for cardiomyocyte purification (see below).

**cAMP measurements.** Light-induced cAMP production in EBs compared to pharmacological stimulation (Fig. 1d) was performed on day 10 of EBs differentiation. For a detailed analysis of light sensitivity of cAMP production (Fig. 1e), cardiomyocytes were purified using lactate replacement of glucose as reported earlier<sup>26</sup> with modifications. Briefly, EBs with clusters of spontaneously beating cardiomyocytes were cultured in high-lactate, non-glucose IMDM from day 8 to day 13 and subsequently dissociated on day 14 in 15 mL falcon tubes with collagenase 4 (280 U mL<sup>-1</sup>, Worthington Biochemical Corporation) on a thermomixer (10 min, 900 rpm, 37 °C). Dissociated cells were replated on 10  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> fibronectin-coated cell culture plates and cultured in normal IMDM medium +20% FCS for 1 day. The following 5 days, cells were kept in high-lactate IMDM and on day 20, purified cardiomyocytes were dissociated for a second time and 5000 cells were plated per well of a 24 multiwell plate. EBs or purified cardiomyocytes were supplemented with 9-Cis retinal (1  $\mu$ M, Sigma-Aldrich) for 30 min and 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX, 50  $\mu$ M, Sigma-Aldrich) directly before stimulation.

For measurement of cAMP in atrial tissue, left and right atria from JellyOp mice were harvested and immobilized by minuten pins in a silicone-coated 3 cm culture dish with 1 mL Tyrode solution containing 1  $\mu$ M 9-Cis retinal and 100  $\mu$ M IBMX.

Light stimulation (2.9 mW mm<sup>-2</sup>, 5 min) was performed using a microscope (MVX10, Olympus) with a  $\times 1$  objective (MVPLAPO1x), a fluorescence microscope light source (X-Cite 120PC, Lumen Dynamics) and a 475/64 bandpass filter (AHF Analysetechnik). After illumination, cells were incubated for 1 h at 37 °C before cell lysis and atrial tissue was manually dissected and dissolved in lysis buffer for 2 h in a thermomixer (21 °C and 900 bpm). cAMP levels were measured in the supernatant after lysis with a homogeneous time-resolved fluorescence competitive immunoassay (cAMP dynamic 2 kit, Cisbio) and a plate reader (Infinite F200 PRO, Tecan) according to the manufacturer's instructions.

**Frequency analysis of ESC-derived cardiomyocytes.** EBs were plated at day 5 of differentiation on 0.1% gelatin-coated glass coverslips and spontaneous beating was analyzed at day 10. Thirty minutes before the experiment, medium was replaced by Tyrode solution (in mM: 142 NaCl, 5.4 KCl, 1.8 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 glucose, and 10 HEPES; pH 7.4) supplemented with 1  $\mu$ M 9-Cis retinal (Sigma-Aldrich). During experiments, EBs were constantly superfused with Tyrode solution without 9-Cis retinal at ~35 °C.

Light stimulation of spontaneously contracting EBs was performed as reported before<sup>7</sup> with a temperature controlled LED module (Omicron LEDMOD LAB, 470 nm, Omicron Laserage) operated by a signal generator (Model 2100, A-M Systems) and coupled to an Axiovert 200 microscope (Zeiss) with an optical fiber. Light was attenuated with a 1% neutral density filter and directed to a  $\times 20$  Fluor objective (numerical aperture: 0.75, Zeiss) by a 580 nm dichroic filter (AHF Analysetechnik). Light intensity was determined at the objective with a power meter and appropriate wavelength correction (PM100 powermeter and S130A sensor, Thorlabs).

To avoid JellyOp activation, an infrared LED (760 nm, 11.8  $\mu$ W mm<sup>-2</sup> at the focal plane) was used for imaging. Spontaneous beating was recorded with a CCD camera (piA640-210gm, Basler) at 51 frames per second and analyzed online using custom-designed software (LabView, National Instruments) as described before<sup>7</sup>. Experiments with frequencies >270 bpm were excluded from analysis because of false detection problems. Only EBs with stable beating frequency (regular baseline beating over 2 min without interruption or arrhythmic episodes) before the start of illumination were used for statistical analysis. To reduce experimental noise from single arrhythmic contractions, the raw frequency response to each light pulse was fitted with an Asym2Sig fit formula (Origin 8, OriginLab)

$$y = y_0 + A \frac{1}{1 + e^{-\frac{x-x_0+t_1}{w_2}}} \left( 1 - \frac{1}{1 + e^{-\frac{x-x_0+t_2}{w_3}}} \right) \quad (1)$$

and the resulting fit trace (Fig. 2b, red line) was used to determine the peak frequency and the mean baseline frequency during 60 s before stimulation. Time constants for inactivation from peak to plateau frequency and for deactivation from peak to baseline frequency were determined by an exponential decay fit (ExpDec1, Origin 8).

**Generation of transgenic mice and heart weight measurements.** Animal experiments were performed in accordance with the guidelines from Directive 2010/63/EU of the European Parliament on the protection of animals used for scientific purposes and were approved by the local ethics review board (Az. 84-02.04.2012A146). Transgenic mice were generated by aggregation of JellyOp expressing, transgenic G4 ESCs with 40 chromosome karyotype and diploid morula stage CD-1 embryos as described previously<sup>25</sup>. Chimeric mice, as identified by their coat color chimerism, were bred to CD-1 mice to test germline transmission. Offspring with agouti coat color were analyzed for inheritance of the transgene by detection of GFP signal in tail tissue.

Hearts were explanted and dried for 5 h at 37 °C. Dry heart weight was normalized to the femur length. The age of mice was >6 months.

**Isolation of adult ventricular cardiomyocytes.** Ventricular cardiomyocytes were isolated from JellyOp mice, as described previously<sup>25</sup>. Briefly, hearts were perfused in the Langendorff configuration with dissociation solution (in mM: 135 NaCl, 4 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 2.5 HEPES, 5 glucose, 25 butanedione monoxime; pH 7.4) for 5 min at 37 °C and then 50  $\mu$ M CaCl<sub>2</sub>, 0.8 mg mL<sup>-1</sup> collagenase B (Roche) and 0.3 mg mL<sup>-1</sup> trypsin (Invitrogen) was added for 12–13 min. Ventricles were cut in small pieces and mechanically dissected, cells were filtered through a nylon mesh and the pellet was resuspended in dissociation solution with 50  $\mu$ M CaCl<sub>2</sub>, 5% FCS but without butanedione monoxime. Subsequently Ca<sup>2+</sup> was increased in four steps to 1.8 mM over 40 min and finally 1  $\mu$ M 9-Cis retinal was added for at least 30 min before patch clamp experiments.

**Electrophysiological measurements.** Single cells were plated at low density on laminin-coated (0.1%) coverslips in I<sub>Ca,L</sub> external solution containing (in mM) 120 NaCl, 5 KCl, 1.8 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 20 TEACl, pH 7.4 with TBAOH. Patch-clamp experiments were performed using an EPC10 amplifier (Heka) in the whole cell configuration. I<sub>Ca,L</sub> was recorded in the voltage clamp mode, the pipette solution contained (in mM) 120 CsCl<sub>2</sub>, 3 MgCl<sub>2</sub>, 3 NaATP, 0.42 NaGTP, 5 Na Phosphocreatine, 10 EGTA, and 5 HEPES, pH 7.2 with CsOH. For measuring peak I<sub>Ca,L</sub> cardiomyocytes were held at a holding potential of -80 mV and a 50 ms long depolarizing voltage step to -40 mV was applied to inactivate I<sub>Na</sub>, followed by a 300 ms depolarizing voltage step to 10 mV to evoke I<sub>Ca,L</sub> every 5 s. Data were acquired at a sampling rate of 20 kHz, filtered at 1 kHz, digitized and analyzed with the Patchmaster and Fitmaster software (Heka).

**Contractility measurements of ventricular cardiomyocytes.** After heart dissociation, a part of ventricular cardiomyocytes was kept at 4 °C in suspension in Tyrode solution containing 1  $\mu$ M 9-Cis retinal, plated on the next day at low density on laminin-coated (0.1%) coverslips and superfused with Tyrode solution at ~35 °C. Cardiomyocytes were electrically (2 ms biphasic pulses, 40 V) paced at 0.5 Hz with two platinum electrodes and a stimulator (Myotronic). Contractions of single cardiomyocytes were recorded with an edge detection system (Myocam S and IonWizard software, Ionoptix). Data was recorded and analyzed with a Powerlab system and the LabChart software (AD Instruments). The average cell shortening of 11 contractions before illumination was compared with the average cell shortening of 11 beats around the maximal peak of cell shortening. Relaxation kinetics were determined by exponential decay fit from 85 to 15% of peak height.

**Stimulation of explanted hearts ex vivo.** Mice were heparinized and sacrificed by cervical dislocation. Hearts were explanted and perfused in Langendorff configuration with Tyrode solution. A bipolar cardiac electrogram was recorded with a silver-chloride electrode placed at the right atrium and a metal spoon under the apex of the heart using a bio-amplifier recording system (PowerLab 8/30, Animal Bio Amp ML 136, LabChart 7.1 software, AD Instruments). Illumination was performed with a macrocope (MVX10, Olympus) equipped with a  $\times$ 1 objective (MVPLAPO1x) using 470 nm LEDs (LED5 and LEDD1, Thorlabs or GCS-0470-50-A510 LED and BLS-13000-1, Mightex) attached to the epifluorescence port. The spatial extent of the illumination was varied using the zoom function of the macrocope. Light intensity was calibrated by with a powermeter (PM100 and S130A, Thorlabs).

To determine maximal frequency increase during light stimulation (Fig. 5c–g), the dorsal part of the right atrium was illuminated with supramaximal intensity (2 mW mm<sup>-2</sup>, 90 s, 104 mm<sup>2</sup> area). After the return of the frequency to baseline, the heart was perfused with isoprenaline (1  $\mu$ M, 4 min). Spectral sensitivity of JellyOp (Fig. 5h) was determined using a monochromator (OptoScan, Cairn-Research) to generate 1 s long illuminations with wavelengths of 470 nm and 400–700 nm in 50 nm steps. To determine peak wavelength ( $\lambda_{max}$ ), normalized frequency values ( $y$ ) at applied wavelength  $\lambda$  were fitted with the Govardovskii normogram equation<sup>17</sup>:

$$y = 1 / \{ \exp[A * (a - x)] + \exp[B * (b - x)] + \exp[C * (c - x)] + D \} \quad (2)$$

with  $x = \frac{\lambda - \lambda_{max}}{\lambda_{max}}$ ,  $A = 69.7$ ,  $a = 0.88$ ,  $B = 28$ ,  $b = 0.922$ ,  $C = -14.9$ ,  $c = 1.104$ ,  $D = 0.674$

Frequency traces were smoothed with a triangular filter (Bartlett, 10 s window). The relative frequency response was normalized to baseline, which was defined as maximal frequency of the smoothed data during a 45 s time interval before stimulation.

To analyze light sensitivity (Fig. 6a, b), hearts were illuminated on the anterior right atrium with brief 100 ms 470 nm light pulses with stepwise increasing light intensities (2–2600  $\mu$ W mm<sup>-2</sup>). For induction of supraventricular extra beats (Fig. 6c, d), the dorsal left atrium at the region of pulmonary vein insertion was illuminated with 190  $\mu$ W mm<sup>-2</sup> for 1 s.

**Histology and immunofluorescence staining.** Cells and hearts were fixed with 4% formaldehyde (PanReac AppliChem). ESCs were incubated with primary antibody against the 1D4 rhodopsin-epitope (1:100, StressMarq) diluted in 5% donkey serum and 0.2% Triton X (PanReac AppliChem) for 2 h at room temperature. Conjugated Alexa Fluor 647 secondary antibody (1:400, Invitrogen)

was applied for 1 h at room temperature. Images of ESCs were acquired using an inverted microscope (Eclipse Ti2, Nikon; Prime BSI camera, Photometrics; Micro-Manager software). 1D4 rhodopsin images were deconvoluted using the Richardson-Lucy Total Variation algorithm ( $N = 20$ ,  $\lambda = 0.0215$ ) and the Born and Wolf point spread function model (DeconvolutionLab2 and PSF Generator Plugins for ImageJ)<sup>27,28</sup>.

Cryopreserved hearts were sectioned with a cryotome (Leica) into 10  $\mu$ m thick slices. After permeabilization with 0.2% Triton X-100 (Fluka) for 10 min and blocking with 5% donkey serum (Jackson ImmunoResearch) for 20 min, primary antibodies against the 1D4 rhodopsin-epitope (1:400, StressMarq) or  $\alpha$ -actinin (1:400, Sigma-Aldrich) diluted in 0.5% donkey serum were applied for 2 h at room temperature. Appropriate Cy-3 and Cy-5 conjugated secondary antibodies (1:400, Jackson ImmunoResearch) diluted in 1  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) were applied for 1 h at room temperature. Fluorescence images of histological sections were acquired with an inverted microscope equipped with an optical section module (Axiovert 200 with ApoTome and AxioVision 4.2, Zeiss).

**Statistics.** Statistics were performed with GraphPad Prism 8.0, GraphPad Software. Data are shown as mean  $\pm$  S.E.M. and a  $p$ -value  $< 0.05$  was considered statistically significant. The  $n$  values in the legends indicate the number of independent experiments (EBs, cardiomyocytes, atria, or hearts). Data were tested for normality (D'Agostino–Pearson test) and for equal variance (Brown–Forsythe test for ANOVA,  $F$ -test for unpaired Student's  $t$ -test). Non-normally distributed data in Fig. 4l, m were analyzed with the Wilcoxon signed-rank test for nonparametric data. Because of unequal variances, data in Figs. 1d, 2e were tested with Welch-ANOVA with Games–Howell post-test. All other data were tested with appropriate paired and unpaired Student's  $t$ -test or ANOVA analysis with Bonferroni post-test. Because of the exploratory nature of this study, effect sizes could not be predicted and thus prior power analysis to determine the sample sizes was not performed.

**Technical note on light sensitivity of JellyOp.** The light intensities required to activate JellyOp for in vitro assays are  $10^4$ – $10^5$  times lower than those needed for optogenetic stimulation of Channelrhodopsin2 in cardiomyocytes ( $\sim 1$  mW mm<sup>-2</sup>)<sup>25</sup> or for stimulation of the artificial light-sensitive chimeric G<sub>s</sub>-coupled receptor opto $\beta_2$ -AR (estimated from the cAMP assay in Airan et al.<sup>29</sup>). The high light sensitivity has advantages in regard to phototoxicity and penetration into tissue, but also results in some challenges for general handling of cells and performance of experiments. For instance, video microscopy had to be performed with infrared LED illumination (760 nm, 11.8  $\mu$ W mm<sup>-2</sup>) to obtain stable basal beating frequencies because white microscope light activated JellyOp resulting in an increase of basal beating frequency. Furthermore, the intensity of room light measured at the JellyOp-sensitive spectrum is in the range of 25  $\mu$ W mm<sup>-2</sup>. In our experimental setting partial activation of the G<sub>s</sub>-signaling cascade by room light could be observed and therefore, all functional experiments were performed in dark rooms with dim red light illumination.

**Reporting summary.** Further information on experimental design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

## Data availability

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Received: 11 July 2018 Accepted: 25 February 2019

Published online: 20 March 2019

## References

- Capote, L. A., Mendez Perez, R. & Lymeropoulos, A. GPCR signaling and cardiac function. *Eur. J. Pharmacol.* **763**, 143–148 (2015).
- Rockman, H. A., Koch, W. J. & Lefkowitz, R. J. Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. *Nature* **415**, 206–212 (2002).
- Lompre, A. M. et al. Ca<sup>2+</sup> cycling and new therapeutic approaches for heart failure. *Circulation* **121**, 822–830 (2010).
- Xiang, Y. K. Compartmentalization of beta-adrenergic signals in cardiomyocytes. *Circ. Res.* **109**, 231–244 (2011).
- Bernardo, B. C., Weeks, K. L., Pretorius, L. & McMullen, J. R. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacol. Ther.* **128**, 191–227 (2010).
- George, C. H. Sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> leak in heart failure: mere observation or functional relevance? *Cardiovasc. Res.* **77**, 302–314 (2008).
- Beiert, T., Brueggemann, T. & Sasse, P. Optogenetic activation of Gq signalling modulates pacemaker activity of cardiomyocytes. *Cardiovasc. Res.* **102**, 507–516 (2014).



8. Koyanagi, M. et al. Jellyfish vision starts with cAMP signaling mediated by opsin-G(s) cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 15576–15580 (2008).
9. Bailes, H. J., Zhuang, L. Y. & Lucas, R. J. Reproducible and sustained regulation of Galphas signalling using a metazoan opsin as an optogenetic tool. *PLoS ONE* **7**, e30774 (2012).
10. Lohse, M. J., Engelhardt, S. & Eschenhagen, T. What is the role of beta-adrenergic signaling in heart failure? *Circ. Res.* **93**, 896–906 (2003).
11. Feldman, D. S., Carnes, C. A., Abraham, W. T. & Bristow, M. R. Mechanisms of disease: beta-adrenergic receptors—alterations in signal transduction and pharmacogenomics in heart failure. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* **2**, 475–483 (2005).
12. Sprenger, J. U. et al. In vivo model with targeted cAMP biosensor reveals changes in receptor–microdomain communication in cardiac disease. *Nat. Commun.* **6**, 6965 (2015).
13. Li, L., Desantiago, J., Chu, G., Kranias, E. G. & Bers, D. M. Phosphorylation of phospholamban and troponin I in beta-adrenergic-induced acceleration of cardiac relaxation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **278**, H769–H779 (2000).
14. Kuschel, M. et al. Ser16 prevails over Thr17 phospholamban phosphorylation in the beta-adrenergic regulation of cardiac relaxation. *Am. J. Physiol.* **276**, H1625–H1633 (1999).
15. O’Connell, T. D., Rodrigo, M. C. & Simpson, P. C. Isolation and culture of adult mouse cardiac myocytes. *Methods Mol. Biol.* **357**, 271–296 (2007).
16. Bondarenko, V. E. A compartmentalized mathematical model of the beta1-adrenergic signaling system in mouse ventricular myocytes. *PLoS ONE* **9**, e89113 (2014).
17. Govardovskii, V. I., Fyhrquist, N., Reuter, T., Kuzmin, D. G. & Donner, K. In search of the visual pigment template. *Vis. Neurosci.* **17**, 509–528 (2000).
18. Gerrard, E. et al. Convergent evolution of tertiary structure in rhodopsin visual proteins from vertebrates and box jellyfish. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **115**, 6201–6206 (2018).
19. DiFrancesco, D. & Tortora, P. Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. *Nature* **351**, 145–147 (1991).
20. Wengrowski, A. M. et al. Optogenetic release of norepinephrine from cardiac sympathetic neurons alters mechanical and electrical function. *Cardiovasc. Res.* **105**, 143–150 (2015).
21. Prando, V. et al. Dynamics of neuro-effector coupling at ‘cardiac sympathetic’ synapses. *J. Physiol.* **596**, 2055–2075 (2018).
22. Patterson, E., Po, S. S., Scherlag, B. J. & Lazzara, R. Triggered firing in pulmonary veins initiated by in vitro autonomic nerve stimulation. *Heart Rhythm* **2**, 624–631 (2005).
23. Irie, M. et al. Involvement of alpha- and beta-adrenoceptors in the automaticity of the isolated guinea pig pulmonary vein myocardium. *J. Pharmacol. Sci.* **133**, 247–253 (2017).
24. Richter, W. et al. Signaling from beta1- and beta2-adrenergic receptors is defined by differential interactions with PDE4. *EMBO J.* **27**, 384–393 (2008).
25. Bruegmann, T. et al. Optogenetic control of heart muscle in vitro and in vivo. *Nat. Methods* **7**, 897–900 (2010).
26. Tohyama, S. et al. Distinct metabolic flow enables large-scale purification of mouse and human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Cell Stem Cell* **12**, 127–137 (2013).
27. Kirshner, H., Aguet, F., Sage, D. & Unser, M. 3-D PSF fitting for fluorescence microscopy: implementation and localization application. *J. Microsc.* **249**, 13–25 (2013).
28. Sage, D. et al. DeconvolutionLab2: an open-source software for deconvolution microscopy. *Methods* **115**, 28–41 (2017).
29. Airan, R. D., Thompson, K. R., Fenno, L. E., Bernstein, H. & Deisseroth, K. Temporally precise in vivo control of intracellular signalling. *Nature* **458**, 1025–1029 (2009).

### Acknowledgements

The authors thank F. Holst and C.C. Vogt (University Bonn) for technical assistance, R. Lucas (Manchester) for providing the JellyOp plasmid and A. Nagy and M. Gertsenstein (Mount Sinai Hospital, Toronto) for providing the G4 mouse embryonic stem cell line. This work was funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation—SA1785/7-1, SA1785/8-1, SA1785/9-1, 214362475/GRK1873/2, Young Investigator Programme of the SPP1926 GO1011/11-1), and the Bonfor Program (Medical Faculty, University of Bonn).

### Author contributions

P.M., T. Bruegmann, B.K.F., and P.S. designed the study. P.M., T. Bruegmann, V.D., D. M., T. Beiert, and P.S. performed experiments and analyzed data. M.H. generated the transgenic mice.

### Additional information

**Supplementary Information** accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09322-7>.

**Competing interests:** The authors declare no competing interests.

**Reprints and permission** information is available online at <http://ngp.nature.com/reprintsandpermissions/>

**Journal peer review information:** *Nature Communications* thanks Terence Hébert and the other anonymous reviewers for their contribution to the peer review of this work. Peer reviewer reports are available.

**Publisher’s note:** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article’s Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article’s Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019

### 3. Danksagung

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern Petra und Dr. Bernd Makowka, die mich auf meinem Weg durch das Studium begleitet und unterstützt haben sowie meinem betreuenden Doktorvater Prof. Dr. Philipp Sasse.

Besonders danken möchte ich meiner Ehefrau Hannah für die Unterstützung und vielen lieben Worte während der Erarbeitung meiner Dissertation.

Danken möchte ich außerdem meinen ehemaligen Mitstudenten Thomas Beiert, Hendrik Lapp, Tobias Brüggmann und Max Funken sowie den weiteren Mitgliedern der AG Sasse (Dr. Daniela Malan, Frank Holz, Chris Vogt), die mich im Rahmen der Promotion angeleitet, begleitet und moralisch unterstützt haben.