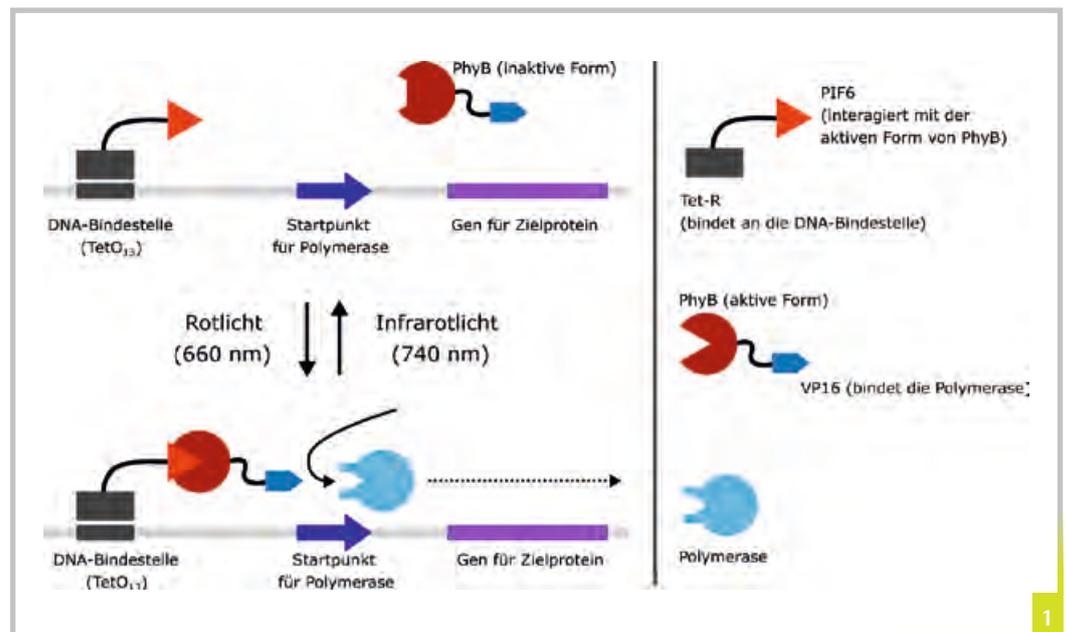


Heilen durch Licht

Der Einsatz optogenetischer Proteinexpression bei Cochlea-Implantaten

Cochlea-Implantate (CI) werden bei Menschen, die kaum oder gar nicht mehr hören können, in die Hörschnecke eingesetzt. Die anschließende Heilung ist entscheidend für den Erfolg der Operation.

Das Institut für Technische Chemie (TCI) erforscht im Rahmen des Exzellenzclusters „Hearing4all“ wie die Einheilung von Cochlea-Implantaten mittels lichtgesteuerter Modulation zellulärer Funktionen verbessert werden kann.



Ein Hörverlust kann unterschiedliche Ursachen haben. Viele davon sind angeboren, andere werden im Laufe des Lebens erworben. Immer kommt es zum Funktionsverlust der Haarsinneszellen in der Hörschnecke (Cochlea). Diese Haarsinneszellen wandeln den Schall in elektrische Signale um, die dann von den Nervenzellen ins Gehirn geleitet und dort zu einem Hörsinnesindruck verarbeitet werden. Dabei sind die Haarzellen sehr empfindlich und über ein weites Frequenzspektrum ansprechbar. Schädigende Faktoren während des Lebens können zum Beispiel chronische Lärmbelastungen, Infektionen oder durchblutungsbedingte Schädigungen sein. Auch ver-

schiedene Medikamente können unter Umständen zum Absterben der Haarzellen führen (ototoxische Wirkstoffe). Ein Verlust der Haarsinneszellen ist permanent, da die Haarzellen nicht nachwachsen. Wenn die Leistung der Haarzellen nicht mehr für eine adäquate Stimulation des Hörnervs ausreicht, können Hörhilfen diese Lücke schließen. Bei starkem oder vollständigem Hörverlust bleibt als Ultima Ratio das Einsetzen eines Cochlea-Implantats in die Hörschnecke. Dann übernimmt das Implantat die Funktion der Haarzellen, also die Umwandlung von Schall in entsprechende elektrische Signale, diese werden über filigrane Elektroden an den Hörnerv in

der Cochlea weitergegeben und ermöglichen so ein Hören.

Das Einsetzen eines Cochlea-Implantats ist ein operativer Eingriff, bei dem ein Elektrodenbündel in die Hörschnecke eingeführt wird und Operationswunden entstehen. Auch das innere Gewebe der Cochlea wird beschädigt und muss verheilen. Besonders wichtig für die langanhaltende gute Funktion des Cochlea-Implantats ist die Heilung der Nerven im Bereich des Cochlea-Implantats, da diese die Signale aufnehmen und weiterleiten müssen. Hier werden im Rahmen von „Hearing4All“ am Institut für Technische Chemie verschiedene Strategien auf Basis der Opto-

genetik für die verbesserte Einheilung der Cochlea-Implantate erforscht.

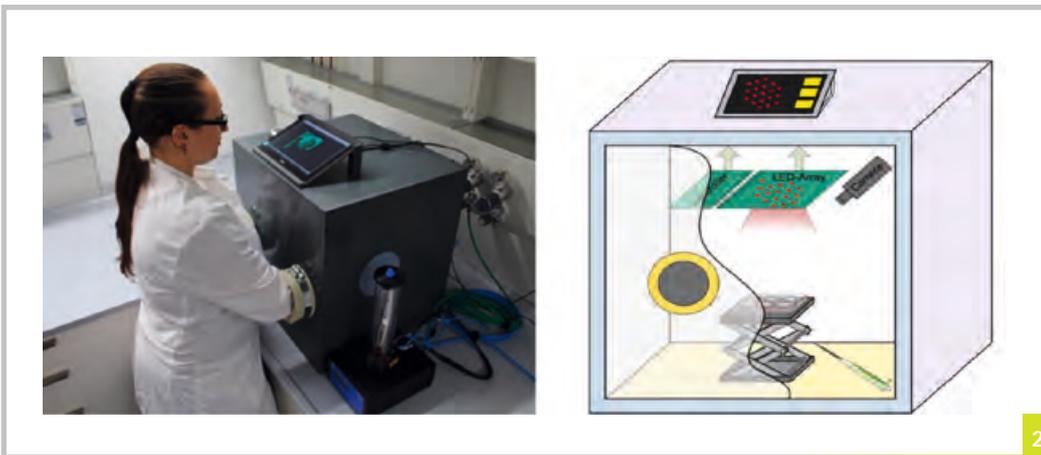
Die Optogenetik setzt Licht zur Modulation von zellulären Funktionen ein und lässt sich in zwei große Teilbereiche aufteilen. Zum einen wird eine Änderung des Membranpotenzials der Zellen durch Lichteinfluss angestrebt. Dies geschieht durch spezielle Proteine, die in der Zellmembran sitzen, sogenannte Kanalrhodopsine. Diese Kanalrhodopsine stammen meist aus speziellen Einzellern und verbinden das Äußere und das Innere ihrer Zelle durch eine

tragen. Dadurch können auch diese Proteine lichtabhängig zueinander in räumliche Nähe gebracht und zu einem funktionalen Komplex zusammengelagert werden. Dabei sind sowohl die lichtabhängigen Proteine als auch die Proteine, die „huckepack“ getragen werden, wie verschiedene Bausteine wechselbar.

Im Institut für Technische Chemie beschäftigt sich ein Teil des AK (Arbeitskreises) Blume (Prof. Dr. med. Cornelia Blume, Dr. Martin Witt, Nina Wichert, M. Sc. und Sina Christophers, M. Sc.) im Rahmen des Exzellenzclusters

Abbildung 1

(modifiziert nach [1], Müller et al, Nucl. Acid Res. 2013). Gezeigt wird exemplarisch das Funktionsprinzip eines optogenetischen Systems zur Steuerung der Proteinproduktion. Das Prinzip der optogenetischen Aktivierung stammt aus der Welt der Pflanzen, die für ihr Überleben auf die Sonne angewiesen sind und daher vielfältige licht-sensitive molekulare Schalter entwickelt haben. Mittlerweile gibt es synthetisch hergestellte optogenetische „Schalter“, die auch in humanen Zellen genutzt werden können. Das Fusionsprotein aus Tet R und PIF6 bindet an die TetO₁₃ Sequenz der DNA, ist aber zunächst nicht in der Lage mit der inaktiven Form des PhyB zu interagieren (oben). Unter Einfluss von Rotlicht der Wellenlänge 660 nm ermöglicht eine Konformationsänderung der Bindungspartner das Zusammensetzen eines Transkriptionsfaktorkomplexes (unten). Dadurch wird die Polymerase aktiviert und beginnt mit der Expression des Zielgens. Durch Bestrahlung mit Infrarotlicht (740 nm) lässt sich eine erneute Konformationsänderung herbeiführen, sodass der Transkriptionsfaktorkomplex wieder zerfällt. Die AG Blume befasst sich mit der Optimierung dieses von einer Freiburger Forschergruppe entwickelten Tools für humane Zellsysteme.



2

Pore, die sich öffnet, sobald Licht der entsprechenden Wellenlänge auf diese Kanalrhodopsine trifft. Anschließend kommt es durch die offene Pore zu einer freien Migration diverser Ionen und damit zu einer Änderung des elektrischen Potenzials an der Membran. So können Neuronen statt mit Strom zusätzlich mit Licht erregt werden.

Der zweite Teilbereich der Optogenetik nutzt Licht, um andere zelluläre Funktionen zu steuern. Zentrales Element dieser Systeme sind Proteine, die sich lichtabhängig zusammenlagern. Diese Proteine stammen häufig aus Pflanzen und können andere Proteine oder Proteinteile „huckepack“

„Hearing4all“ mit der lichtgesteuerten Produktion spezieller Proteine in Zellen. Dazu wird die lichtabhängige Interaktion verschiedener Proteinpaaare zum Beispiel PhyB und PIF6 oder Cry2 und CIB aus dem Acker-Schmalwand (*Arabidopsis thaliana*) genutzt, um via Geninduktion mit nachfolgender Proteinbiosynthese in humanen Zellen den Zeitpunkt und die Stärke der Zielproteinproduktion zu bestimmen. Dabei trägt der eine Partner des lichtabhängigen Paares ein Protein, das an eine spezielle DNA-Sequenz bindet (hier Tet-R an TetO₁₃), und der andere Partner ein Protein, das in der Lage ist, durch die Bindung einer Polymerase die Produktion des Zielproteins

Abbildung 2

Beleuchtungsbox für optogenetische Zellkultur: Nina Wichert M. Sc. beim Arbeiten in der LED-basierten Beleuchtungsbox. Diese ermöglicht eine gezielte Bestrahlung der optogenetisch veränderten humanen Zellen mit Licht spezifischer Wellenlängen und verhindert eine Selbstaktivierung der Zellen durch Umgebungslicht. Während die Arme über Armschlitz mit Ärmelhalter in die Box eingeführt werden, wird das Handling der Zellen in der sonst dunklen Box über ein Tablet mit Kamera beobachtet. Die Zellen sind auf einem höhenverstellbaren Zellkulturgefäßhalter und in einer erwärmten und mit CO₂ und Wasserdampf equilibrierten Halterkammer (ibidi GmbH, Gräfelfind, Deutschland) positioniert.

zu vermitteln (hier VP16, vergleiche Abbildung 1).

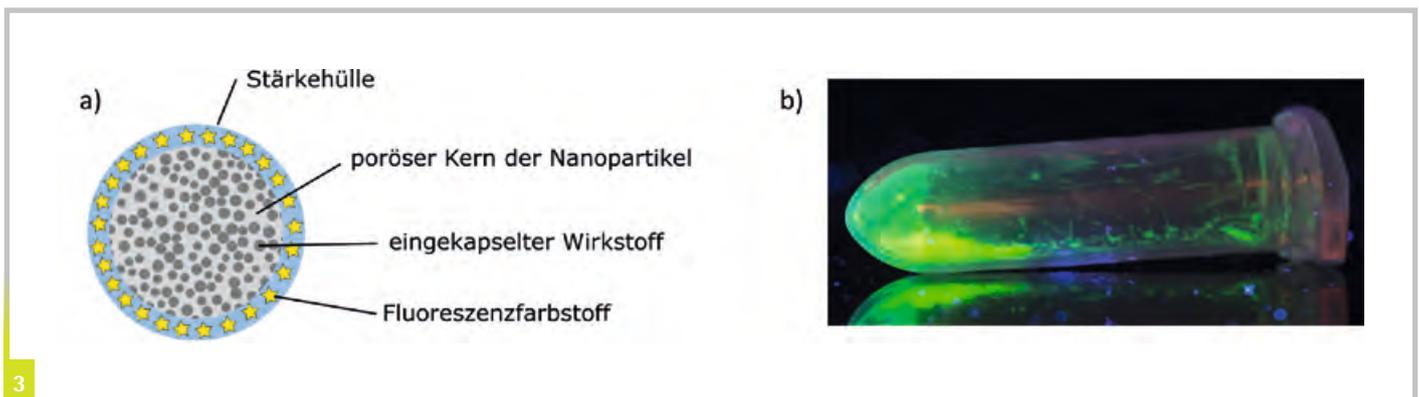
Die Hauptvorteile von optogenetischen Systemen im Vergleich zu herkömmlichen Verfahren zur Steuerung der Proteinproduktion sind eine wesentlich verbesserte räum-

liche und zeitliche Auflösung im Mikromilieu zum Beispiel von neuronalem Gewebe. So können Aktivierung und Deaktivierung, je nach verwendeten lichtabhängigen Proteinen, im Sekunden- bis Minutenbereich durchgeführt werden und der Einsatz von fokussiertem Licht ermöglicht eine starke Eingrenzung des räumlichen Bereichs, zum Beispiel im Innenohr eines Kindes.

Beispiel Lipofektion), andererseits über ein lentivirales System. Die Herausforderung beim Gentransfer zum Beispiel in undifferenzierte humane Stammzellen aus dem menschlichen Fettgewebe (so genannte Ad-hMSCs) besteht darin, dass neben dem optogenetischen Schalter auch das Zielgen in einem bestimmten stöchiometrischen Verhältnis eingebracht werden muss. Dies kann via Co-Transfektion

Hülle versehen, die für diese Wirkstoffe zunächst undurchdringlich ist (Abbildung 3). Die Zellen werden dann so programmiert, dass sie nach Lichtbestrahlung ein Enzym für den Abbau der Partikelhülle produzieren, so werden die Wirkstoffe zeitlich gesteuert aus den Partikeln freigesetzt.

Ein direkterer Ansatz zur Verbesserung der Implantat-Ein-



3

Abbildung 3
Schematischer Aufbau der porösen Nanopartikel mit eingekapseltem Wirkstoff und Stärkehülle (a). Synthetisierte Partikel mit Fluoreszenzfarbstoff zu späteren Lokalisierung der Partikel (b).

Für die Untersuchungen der optimalen Lichtaktivierung wurde in Kooperation mit dem Institut für Mikroelektronische Systeme bereits eine Kultivierungsumgebung für die Lichtaktivierung mittels LED-Lampen gebaut (Abbildung 2).

Eine höhere räumliche Auflösung der Lichtaktivierung wurde dagegen mit einer punktgenauen Bestrahlung mittels wellenlängenspezifischen Lasern erreicht (Kooperation mit dem Institut für Laseroptik der LUH, Prof. Dr. A. Heisterkamp). Hierbei wird das Zellpräparat mäanderartig punktbestrahlt, die Führung des Lasers geschieht softwaregesteuert.

Die Einbringung der verschiedenen Vektoren mit den optogenetischen Sequenzen und dem Zielgen geschieht einerseits über zellschonende transiente Verfahren (zum

oder mittels diverser Genpromotoren auch auf einem Vektor realisiert werden.

Neben der Erforschung der Technologie an sich werden im Rahmen des Exzellenzclusters „Hearing4all“ auch direkte Anwendungen untersucht. Zusätzlich zu den einzelnen Bausteinen des optogenetischen Systems kann auch das Zielprotein ausgetauscht werden, oder es können mehrere Zielproteine gleichzeitig eingesetzt werden. Daher können mit diesen „Lichtschaltern“ eine Reihe unterschiedlicher Strategien für eine verbesserte Einheilung von Cochlea-Implantaten verfolgt werden. Dazu arbeitet das Institut für Technische Chemie beispielsweise mit dem Institut für Anorganische Chemie der Leibniz Universität Hannover unter Prof. Dr. rer. nat. Peter Behrens zusammen. Hier werden biokompatible Nanopartikel mit verschiedenen Wirkstoffen beladen und mit einer

heilung ist die Produktion des Wachstumsfaktor BDNF („Brain-derived neurotrophic factor“; dt. etwa: „Vom Gehirn stammender neurotropher Faktor“). Dieser Wachstumsfaktor schützt bereits bestehende Nervenzellen und stimuliert das Wachstum neuer Synapsen. Bei einer Produktion von BDNF in der Nähe eines Cochlea-Implantats wird also eine wesentliche verbesserte Einheilung nach der Implantation und eine gesteigerte Überlebensfähigkeit der geschädigten Nervenzellen erwartet.

Neben der Forschung an Anwendungen, die später direkt den Patienten zukommen sollen, ist die lichtgesteuerte Produktion von Proteinen auch eine gute Methode für die Untersuchung der Proteinfunktion innerhalb der Zelle und im komplexen Organismus. Von dem Membranprotein Claudin 14 ist bekannt, dass verschiedene Mutationen durch Mem-

brandestabilisierung zum Absterben der Haarsinneszellen innerhalb weniger Wochen nach der Geburt führen. Auch wenn Claudin 14 gar nicht mehr gebildet wird, sterben die Haarzellen im Innenohr nach kurzer Zeit ab. Werden die Haarzellen dagegen vor dem Absterben entnommen und im Labor weiter kultiviert, sind diese weiter lebensfähig. Diese Diskrepanz zwischen der Situation im Innenohr und im Labor ist noch immer nicht geklärt und daher Gegenstand aktueller Untersuchungen. Dazu soll nun die gute zeitliche Auflösung der optogenetischen Systeme genutzt werden, um eine genauere Vorstellung der Funktionen von Claudin 14 zu erhalten. Ein Mausmodell, bei dem die Expression eines bestimmten Gens für das Membran-Protein Claudin 14 inaktiviert wurde (Knock-Out Maus-Modell für Claudin 14)

von der Universität Oldenburg (AG Prof. Dr. rer. nat. Nothwang) dient als Quelle für KO-Zellen aus dem Innenohr der Mäuse (Entnahme und Kultivierung durch die AG von PD Dr. med. Athanasia Warnecke, Klinik f. HNO-Heilkunde der MHH). Die Gensequenz von Claudin 14 wird von der AG Blume zusammen mit dem optogenetischen Schalter in neuronale und neuron-unterstützende Zellen via Transfektion eingebracht und die kultivierten, transfizierten Zellen morphologisch beschrieben.

Sollte es gelingen, die Synthese bestimmter Faktoren in humanen Zelltypen über optogenetische Systeme zeitlich und räumlich optimiert zu etablieren und auch eine effiziente Proteinsynthese und lichtgesteuerte Wirkstofffreisetzung nachzuweisen, wären optogenetisch manipulierte Zellen

ein Mittel, welches in Zukunft auch in klinischen Therapien eingesetzt werden könnte. Cochlea-Implantate könnten beispielsweise mit optogenetisch veränderten menschlichen Stammzellen vor der Implantation ummantelt werden. Nach der Implantation kann dann die gezielte und langfristige Aktivierung den Einheilungsprozess zu verbessern.

Literatur

- [1] Müller et al: A red/far-red light-responsive bi-stable toggle switch to control gene expression in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 2013 Apr;41(7):e77. doi: 10.1093/nar/gkt002



apl. Prof. Dr. Cornelia Blume

Jahrgang 1968, ist derzeit als Gruppenleiterin am Institut für Technische Chemie tätig. Ihr Arbeitskreis bearbeitet Themen im Bereich des Tissue Engineering, der Biomedizintechnik sowie medizinische und biotechnologische Grundlagen für moderne Diagnostika. Sie ist außerdem selbst als Nephrologin im KfH (Kuratorium für Dialyse und Nierentransplantation e. V.) klinisch tätig. Kontakt: blume@iftc.uni-hannover.de



Dr. Martin Witt

Jahrgang 1988, ist derzeit wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Technische Chemie (TCI). Sein Forschungsinteresse liegt auf den neuen Möglichkeiten der modernen Molekularbiologie und der synthetischen Biologie zur Behandlung degenerativer Erkrankungen. Kontakt: witt@iftc.uni-hannover.de



Nina Wichert, M. Sc.

Jahrgang 1991, ist derzeit als Promotionsstudentin am Institut für Technische Chemie (TCI). In ihrer Promotion beschäftigt sie sich mit dem Vergleich verschiedener optogenetischer Systeme sowie mit Methoden des DNA-Transfers in Stammzellen. Kontakt: wichert@iftc.uni-hannover.de



Sina Christoffers, M. Sc.

Jahrgang 1992, ist derzeit als Promotionsstudentin am Institut für Technische Chemie (TCI). Sie beschäftigt sich mit dem optogenetischen System auf Basis des lichtaktivierbaren Proteinpaares Cry2/CIB und möglichen therapeutischen Anwendungen. Kontakt: christoffers@iftc.uni-hannover.de