

Extrazelluläre Optogenetik

Rotlicht-gesteuerter viraler Gentransfer mit Einzelzellauflösung

MAXIMILIAN HÖRNER, WILFRIED WEBER

FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE, BIOS, EXZELLENZCLUSTER CIBSS – CENTRE FOR INTEGRATIVE BIOLOGICAL SIGNALLING STUDIES, UNIVERSITÄT FREIBURG

Available methods for efficient gene transfer into user-selected or even single cells suffer from high invasiveness or the need for complicated equipment. Here, we present a technology for the light-guided transduction of native cell lines and primary cells by adeno-associated viral (AAV) vectors. We demonstrate the spatially resolved transduction of different cells with different genes within one culture and the selective transduction of single cells by local illumination.

DOI: 10.1007/s12268-021-1643-z
© Die Autoren 2021

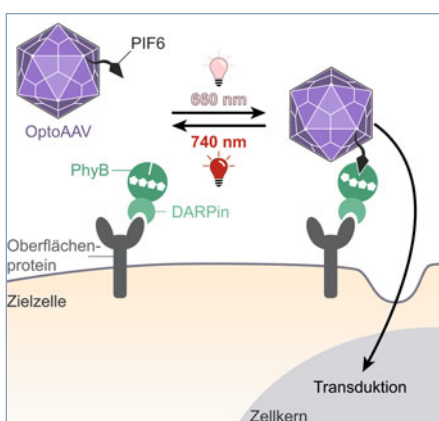
■ Fortschritte in der Einzelzellsequenzierung sowie in multimodalen Einzelzell-Omics-Ansätzen ermöglichen ein neues, faszinierendes Verständnis der Heterogenität von Zellen in multizellulären Organismen [1]. Das Wissen über Prozesse auf Einzelzellebene wächst kontinuierlich, katalysiert

durch kostengünstigere und einfacher zu handhabende Techniken zur Einzelzellanalyse. Im Gegensatz zu dieser Entwicklung hinken Technologien zur genetischen Manipulation von Einzelzellen hinterher. Ein optimales System hierfür würde folgende Eigenschaften aufweisen: (i) die Kontrolle über den Gentransfer sollte außerhalb der Zelle liegen, um Nebenwirkungen auf andere Zellen zu vermeiden, (ii) die Technik sollte so wenig wie möglich invasiv sein und (iii) mehrfach anwendbar sein, um innerhalb einer Kultur verschiedene Gene in verschiedene Zellen einbringen zu können. (iv) Zudem sollte der Gentransfer mit einer Standardlaborausrüstung durchführbar sein und (v) einen hohen Durchsatz erlauben. (vi) Schlussendlich sollte der Gentransfer sowohl in unmodifizierten Zelllinien als auch Primärzellen möglich sein. Etablierte Verfahren zum gezielten Gentransfer, wie z. B. die Einzelzellinjektion oder die lichtinduzierte Permeabilisierung der Zell- oder Endosomenmembran, sind entweder langwierig, benötigen komplizierte Geräte oder sind mit einer hohen Toxizität für die Zielzelle verbunden [2–4]. Mit der hier vorgestellten OptoAAV-Technologie überwinden wir diese Einschränkungen [5]. Dieses System basiert auf Adeno-assoziierten viralen (AAV) Vektoren, einem Standardwerkzeug für den Gentransfer in Zellkultur und Tiermodellen bis hin

zur gentherapeutischen Anwendung im Menschen [6]. Mit OptoAAV ist es möglich, selektiv einzelne Zellen durch die Beleuchtung mit zellverträglichem rotem Licht niedriger Intensität zu transduzieren.

Aufbau des OptoAAV-Systems

Die OptoAAV-Technologie besteht aus einem modifizierten AAV-Vektor (OptoAAV) und einem Adapterprotein, das für die lichtabhängige Rekrutierung des OptoAAVs an die Zielzelle verantwortlich ist (**Abb. 1**). Bei dem viralen Vektor haben wir dessen natürlichen Tropismus für Heparansulfat-Proteoglykan, das auf der Oberfläche von Zellen vorkommt, durch zwei Punktmutationen in den viralen Kapsidproteinen entfernt. Damit kann der virale Vektor selbst nicht bzw. nur noch sehr ineffizient an Zellen binden. Zudem haben wir an das virale Kapsidprotein VP2 eine gekürzte Version des Phytochrom-Interaktionsfaktor 6 (PIF6) fusioniert. Das Adapterprotein besteht aus einem DARPin, das an ein ausgewähltes Protein auf der Zelloberfläche bindet, und einer gekürzten Version von Phytochrom B (PhyB). DARPins (*designed ankyrin repeat protein*) sind kleine künstliche Proteine, die wie Antikörper spezifisch an ausgewählte Antigene binden und mit hoher Ausbeute im Bakterium *Escherichia coli* produziert werden können [7]. In dem OptoAAV-System haben wir uns die Eigenschaft der Proteine PhyB und PIF6 aus der Pflanze *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand) zunutze gemacht, dass diese unter Beleuchtung mit rotem Licht (Wellenlänge ca. 660 nm) innerhalb von Sekunden interagieren. Dadurch kommt es durch das Adapterprotein zur Rekrutierung des OptoAAVs an die Oberfläche der Zelle und damit zu deren Transduktion. Ein weiterer Vorteil dieses natürlichen pflanzlichen Rotlicht-rezeptorsystems ist, dass die Interaktion beider Proteine durch die Beleuchtung mit dunkelrotem Licht (Wellenlänge ca. 740 nm) innerhalb von Sekunden gestoppt werden kann. Somit kann die Transduktion von mit dunkelrotem Licht beleuchteten Zellen verhindert werden.



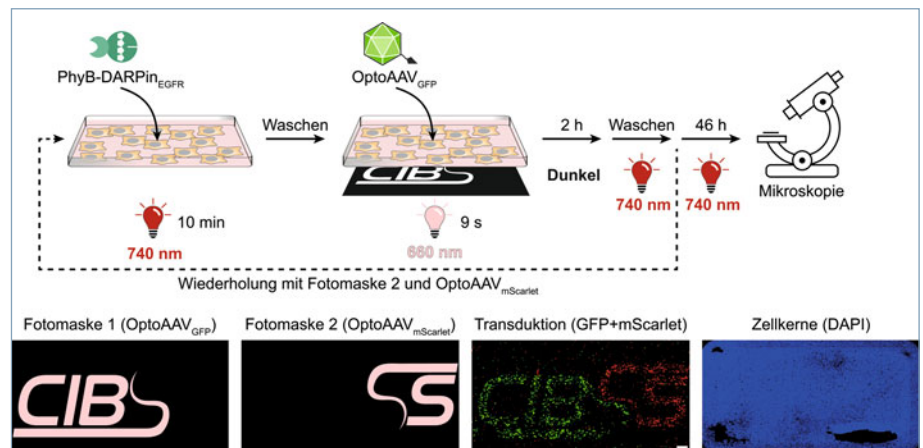
▲ **Abb. 1:** OptoAAV-Funktionsweise. Die Rotlicht (660 nm)-induzierte Interaktion von Phytochrom B (PhyB) und PIF6 führt zur Rekrutierung des modifizierten Adeno-assoziierten viralen Vektors (OptoAAV) an die Zelloberfläche und damit zur Transduktion. Der DARPin ist ein antikörperähnliches synthetisches Protein, das gegen ein zelluläres Oberflächenprotein gerichtet ist und modular ausgetauscht werden kann. Angepasst aus [5].

Örtlich und zeitlich kontrollierte Transduktion

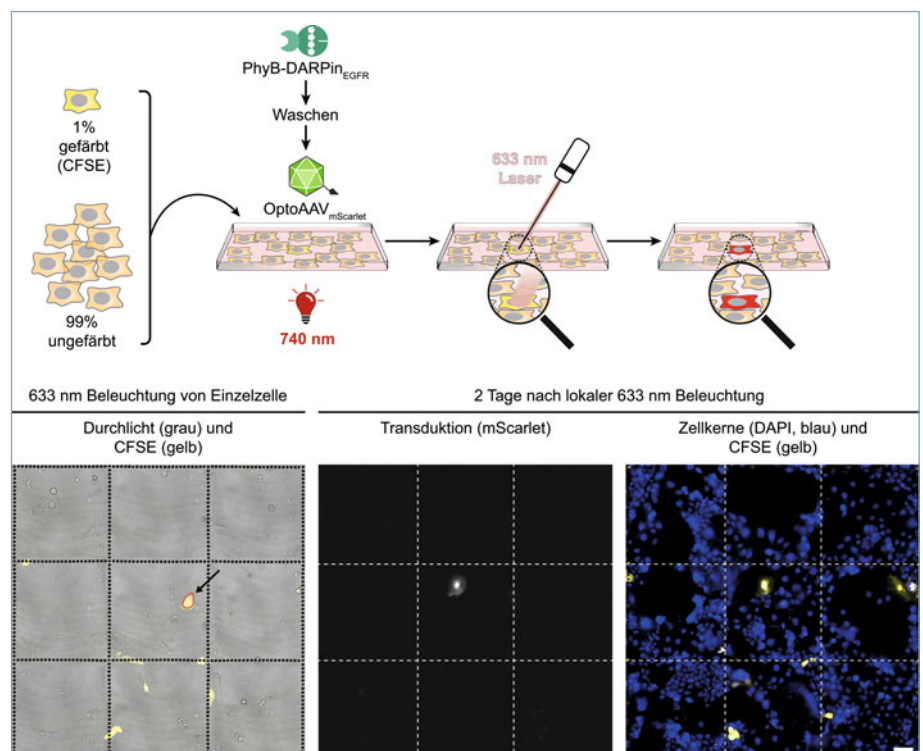
Da die Transduktion von Zellen durch das OptoAAV-System präzise örtlich und zeitlich kontrolliert werden kann, ermöglicht es die Technologie, verschiedene Gene in verschiedene Zellen einer Kultur ortsaufgelöst einzubringen. Um dies zu zeigen, haben wir eine Kultur der humanen Epidermoid-Karzinom-Zelllinie A-431 für zehn Minuten mit einem Adapterprotein, das spezifisch an den EGF-Rezeptor auf A-431-Zellen bindet, unter Beleuchtung mit 740-nm-Licht inkubiert (**Abb. 2**). Nach einem Waschschrift zum Entfernen des ungebundenen Adapterproteins haben wir einen OptoAAV, der ein Gen für das grüne Fluoreszenzprotein GFP trägt, zu den Zellen gegeben und die Kultur ortsaufgelöst mithilfe einer Fotomaske für neun Sekunden mit 660-nm-Licht niedriger Intensität ($0,3 \text{ mW cm}^{-2}$) beleuchtet. Nach einer Inkubation von zwei Stunden im Dunkeln haben wir die Kultur gewaschen und das eben beschriebene Prozedere mit einer zweiten Fotomaske und einem OptoAAV, der für das rote Fluoreszenzprotein mScarlet codiert, wiederholt. Die anschließende Analyse der Expression der beiden Fluoreszenzproteine mittels Fluoreszenzmikroskopie nach zwei Tagen hat gezeigt, dass wir erfolgreich ortsaufgelöst unterschiedliche Zellen in derselben Kultur mit verschiedenen Genen transduzieren konnten.

Gentransfer in einzelne Zellen

Die lokale Beleuchtung von Zellen mithilfe von Fotomasken erlaubt nur eine relativ geringe örtliche Auflösung in der Größenordnung von mehreren 100 Mikrometern, sodass nur Zellverbände und keine Einzelzellen einer Kultur damit spezifisch beleuchtet werden können. Die örtliche Auflösung kann jedoch durch die Nutzung eines herkömmlichen Konfokalmikroskops einfach bis in den Mikrometer-Bereich erhöht werden. Um eine beleuchtete Zelle nach zwei Tagen wieder identifizieren zu können, haben wir ein Prozent der Zellen einer A-431-Zellkultur mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFSE markiert und auf einem Deckglas mit einem beschrifteten Rastergitter ausgesetzt (**Abb. 3**). Nach sequenzieller Zugabe des Adapterproteins und OptoAAV_{mScarlet} unter 740-nm-Beleuchtung haben wir eine ausgewählte CFSE-positive Zelle für 120 Millisekunden mit dem 633-nm-Laser des Mikroskops beleuchtet und die Kultur nach zwei Tagen auf die Expression des Fluoreszenz-



▲ **Abb. 2:** Örtlich aufgelöste Transduktion einer Zellkultur mit zwei Transgenen. Eine Kultur von A-431-Zellen wurde nacheinander mit PhyB-DARPin_{EGFR} und OptoAAV_{GFP} inkubiert und lokal durch Fotomaske 1 mit 660-nm-Licht beleuchtet. Anschließend wurde die Prozedur mit Fotomaske 2 und OptoAAV_{mScarlet} wiederholt und nach zwei Tagen die Transduktion mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Maßstabsleiste: 1 mm. Angepasst aus [5].



▲ **Abb. 3:** Transduktion einer ausgewählten Einzelzelle. Eine A-431-Zellkultur mit ein Prozent CFSE-gefärbten Zellen (zur Wiedererkennung der Zellen bei der Analyse) wurde nacheinander mit PhyB-DARPin_{EGFR} und OptoAAV_{mScarlet} inkubiert und anschließend eine CFSE-positive Zelle mit dem 633-nm-Laser eines Konfokalmikroskops beleuchtet (rote Markierung). Die Analyse der Transduktion erfolgte nach zwei Tagen mittels Fluoreszenzmikroskopie. Maßstab: 100 μm . Angepasst aus [5].

proteins mScarlet hin untersucht. Hierbei konnten wir in 60 Prozent aller Experimente eine Transduktion der beleuchteten Zelle beobachten, während von allen nicht beleuchteten Zellen nur ein Prozent eine mScarlet-Fluoreszenz aufwies.

Zusammenfassung und Ausblick

Die OptoAAV-Technologie ermöglicht eine hochspezifische Transduktion von Zielzellen. Die Spezifität wird über zwei Mechanismen sichergestellt; einerseits wird ein spezifisches Adapterprotein verwendet, um mög-

che Zielzellen zu markieren, andererseits wird die Transduktion über die lichtgesteuerte Aktivierung des Fotorezeptors PhyB auf der Zielzelle vermittelt. Diese Technologie komplementiert die Fortschritte in der Einzelzellanalyse und ermöglicht, durch das gezielte Einbringen von genetischer Information, synthetisch eine Heterogenität herbeizuführen. Dies stellt eine aussagekräftige Methode dar, um Hypothesen zu testen oder vorhergehende Analysen über einen synthetischen Ansatz zu bestätigen. Darüber hinaus bietet OptoAAV im Bereich des Tissue Engineerings neue Möglichkeiten zur orts- und zeitaufgelösten Kontrolle des Wachstums und der Differenzierung von Zellen durch das gezielte Einführen von entsprechenden Expressionskassetten. Ebenso ist die Weiterentwicklung von OptoAAV für therapeutische Anwendungen vielversprechend. So wurde z. B. vorgeschlagen, über diese Technologie bei blinden Menschen gezielt lichtabhängige Ionenkanäle in Retinazellen einzufügen, um wieder eine Lichtwahrnehmung zu ermöglichen [8]. Dank des modularen Aufbaus ist eine Anpassung der OptoAAV-Technologie für diese und andere Anwendungen in der grundlagenorientierten sowie der angewandten Forschung zielgerichtet und effizient möglich.

Danksagung

Die Entwicklung von OptoAAV wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft im Rahmen der Exzellenzinitiative (BIOSS, EXC-294) sowie der Exzellenzstrategie (CIBSS, EXC-2189, Projekt-ID 390939984) gefördert. ■

Literatur

- [1] Schier AF (2020) Single-cell biology: beyond the sum of its parts. *Nat Methods* 17: 17–20
- [2] Bono N, Ponti F, Mantovani D et al. (2020) Non-viral in vitro gene delivery: it is now time to set the bar! *Pharmaceutics* 12: 183
- [3] Stevenson DJ, Gunn-Moore FJ, Campbell P et al. (2010) Single cell optical transfection. *J R Soc Interface* 7: 863–871
- [4] Jerjes W, Theodossiou TA, Hirschberg H et al. (2020) Photochemical internalization for intracellular drug delivery. From basic mechanisms to clinical research. *J Clin Med* 9: 528
- [5] Hörner M, Jerez-Longres C, Hudek A et al. (2021) Spatiotemporally confined red light-controlled gene delivery at single-cell resolution using adeno-associated viral vectors. *Sci Adv* 7: eabf0797
- [6] Wagner HJ, Weber W, Fussenegger M (2021) Synthetic biology: emerging concepts to design and advance adeno-associated viral vectors for gene therapy. *Adv Sci* 8: 2004018
- [7] Plückthun A (2015) Designed ankyrin repeat proteins (DARPs): binding proteins for research, diagnostics, and therapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 55: 489–511
- [8] BioTechScope (2021) An optical remote control for gene transfer. <https://biotechscope.com/optical-remote-control-gene-transfer/>

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle

ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadressen:

Dr. Maximilian Hörner
 Universität Freiburg
 Fakultät für Biologie
 Schänzlestraße 18
 D-79104 Freiburg im Breisgau
maximilian.hoerner@biologie.uni-freiburg.de
www.bioss.uni-freiburg.de/de/dr_maximilian_hoerner

Prof. Dr. Wilfried Weber
 Universität Freiburg
 Fakultät für Biologie
 Schänzlestraße 18
 D-79104 Freiburg im Breisgau
wilfried.weber@biologie.uni-freiburg.de
www.cibss.uni-freiburg.de/about/cibss-investigators/person/prof-dr-wilfried-weber

AUTOREN



Maximilian Hörner

2005–2011 Studium der Molekularen Biotechnologie (B.Sc. und M.Sc.) an der Universität Heidelberg mit Forschungsaufenthalt 2019 an der Harvard Medical School in Boston, MA, USA. 2011–2017 Promotion im Bereich Synthetischer Biologie in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. W. Weber, Universität Freiburg. Seit 2018 Nachwuchsgruppenleiter an der Fakultät für Biologie der Universität Freiburg.



Wilfried Weber

2000 Diplom in Biotechnologie. 2000–2005 Promotion und Postdoc, Institut für Biotechnologie, ETH Zürich, Schweiz. 2006–2009 Gruppenleiter, Institut für Chemie- und Bioingenieurwesen sowie Department für Biosysteme, ETH Zürich, Habilitation in Biotechnologie. Seit 2009 Professor (W3) für Synthetische Biologie, Universität Freiburg, seit 2019 Mitglied Sprecherteam Exzellenzcluster CIBSS.