

Dr. Laura Laprell

»Blinde wieder sehen lassen«

Der vorliegende Beitrag wurde beim Deutschen Studienpreis 2016 mit einem 2. Preis in der Sektion Natur- und Technikwissenschaften ausgezeichnet. Er beruht auf der 2015 an der Ludwig-Maximilians-Universität München eingereichten Dissertation »Photopharmacology: Restoration of Vision Using Photochromic Ligands« von Dr. Laura Laprell.

Blinde wieder sehen lassen

Dr. Laura Laprell

Sehen ist unumstritten einer der wichtigsten Sinne des Menschen, und der Sehverlust ist für die Betroffenen verheerend. Weltweit sind mehr als 300 Millionen Menschen von degenerativen Netzhauterkrankungen betroffen. In unterschiedlichen Lebensstadien können sich eine Reihe verschiedener Krankheitsbilder manifestieren.

Eine der häufigsten Ursachen von Erblindung bei über 50-jährigen ist die altersbedingte Makuladegeneration (AMD); sie allein betrifft in Deutschland geschätzt an die vier Millionen Menschen. In Industriestaaten ist AMD die Hauptursache von Erblindung (<http://www.pro-retina.de>), gefolgt von Glaukom, diabetischer Retinopathie und Retinitis Pigmentosa, einer erblich bedingten degenerativen Netzhauterkrankung.

Zum aktuellen Zeitpunkt gibt es keine Therapie zur Heilung von Blindheit. Menschen, die erblindet sind, werden ihr Leben lang auf andere angewiesen sein. Damit geht nicht nur ein großer Teil ihrer Unabhängigkeit verloren, sondern auch das soziale Netzwerk um sie herum wird auf eine harte Probe gestellt.

Der aktuelle Stand der Forschung

Bei degenerativen Erkrankungen der Netzhaut gehen aus unterschiedlichen Gründen die lichtsensitiven Photorezeptorzellen verloren. Mal verläuft dieser Prozess schneller, mal langsamer, letztendlich führt er aber immer zur vollständigen Erblindung. Abbildung 1 zeigt Bilder einer gesunden sowie einer degenerierten Netzhaut von Mäusen. In erkrankten Mäusen sind bereits wenige Wochen nach der Geburt die lichtsensitiven Photorezeptorzellen der Netzhaut vollständig verschwunden.

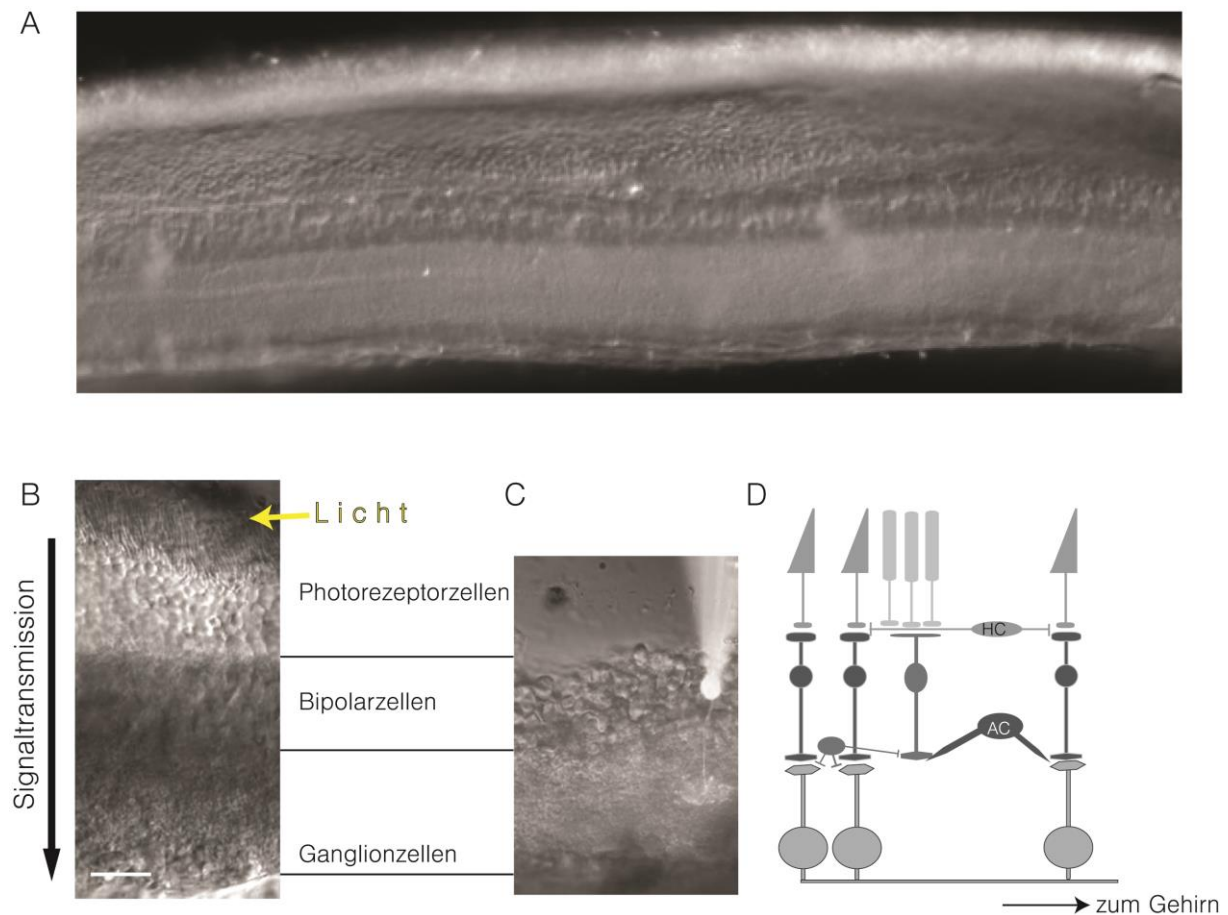


Abbildung 1: Struktur und Funktion einer normalen Netzhaut

(A) Durchlichtbild einer Maus-Netzhaut im Mikroskop nach Schnittpräparation. (B) Vergrößerung eines Ausschnitts aus Abbildung A. Von oben nach unten: Photorezeptorzellen, Bipolarzellen und Ganglionzellen. Licht wird von einer Photorezeptorzelle in chemische Energie umgewandelt, die dann an die darunterliegenden Zellschichten übermittelt wird. Balken 50 µm. (C) Durchlichtaufnahme einer Netzhautschnittpräparation einer blinden Maus. Die Photorezeptorzellen sind vollständig degeneriert. Zusätzliche Ansicht einer Bipolarzelle, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff gefüllt wurde (rechts). (D) Grafische Darstellung einer gesunden Netzhaut. Reihenfolge wie in Abbildung B. Zusätzlich dargestellt sind inhibitorische Interneurone, Horizontalzellen (HC) und Amakrinzellen (AC), die der internen Verschaltung der Netzhaut dienen.

Zahlreiche Forschergruppen arbeiten weltweit an unterschiedlichen Ansätzen, den Sehprozess nach Verlust der lichtsensitiven Photorezeptorzellen zu reanimieren. Die Forschergruppe um Professor Botond Roska am Friedrich Miescher Institute in Basel versucht zum Beispiel mit Hilfe von viralen Vektoren, sogenannten Genfähren, lichtsensitive Proteine in Bipolarzellen einzubringen. In einer gesunden Netzhaut verbinden die Bipolarzellen die lichtsensitiven Photorezeptorzellen mit den Ganglionzellen, die dann das Lichtsignal als ein elektrisches Signal in die visuellen Zentren des Gehirns weiterleiten. In einer blinden Netzhaut werden durch die artifizielle, lichtabhängige Aktivierung der Bipolarzellen auf diese Weise eigentlich blinde Zellen zu sehenden Zellen (Abbildung 2 A und B).

Einen völlig anderen Ansatz verfolgt die Forschergruppe um Professor Eberhart Zrenner am Universitätsklinikum Tübingen. Hier wird ein 3 x 3 Millimeter kleiner elektronischer Chip auf die Netzhaut

implantiert. Dieser Chip hat 1.500 Elektroden, die einfallendes Licht in elektrische Signale umwandeln. Die so erzeugten Signale werden auf die Nervenzellen der Netzhaut übertragen und schließlich an das Gehirn weitergeleitet (Abbildung 2 C).

Beide Forschungsansätze sind vielversprechend und können zur Heilung von Blindheit beitragen, bringen aber auch gewisse Herausforderungen mit sich.

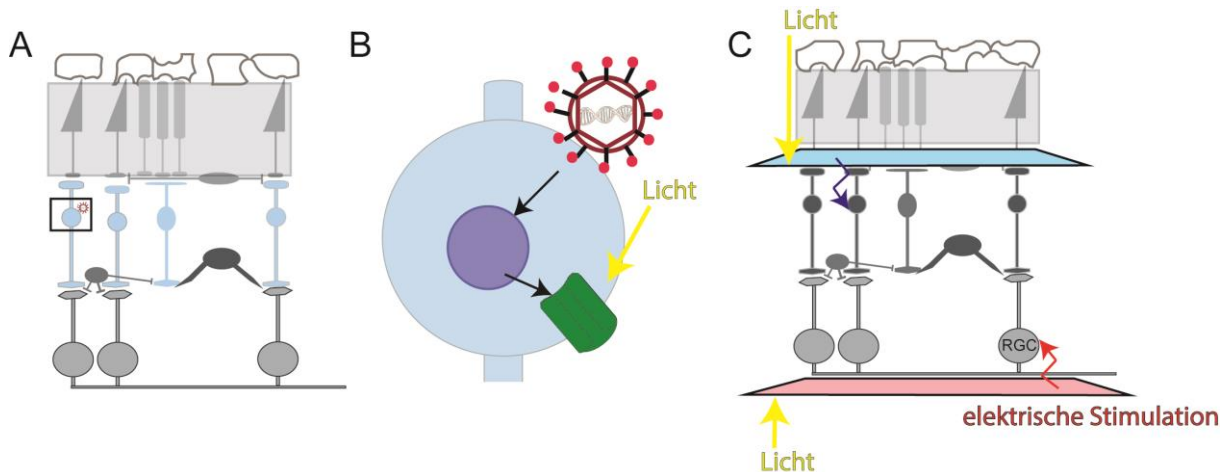


Abbildung 2: Aktuelle Ansätze zur Wiederherstellung des Sehvermögens

(A) Schematische Darstellung einer Netzhaut. Die Photorezeptorzellen sind in einer degenerierten Netzhaut nicht mehr vorhanden. (B) Vergrößerung der Box in Abbildung A. Mittels viraler Vektoren schleusen Forscher das genetische Material für neue Rezeptoren in die Zellkerne der Bipolarzellen ein (violetter Punkt). Nach Expression dieser neuen Rezeptoren (grün) wird die eigentlich lichtunempfindliche Bipolarzelle durch Licht aktivierbar. (C) Ansätze der Elektronenimplantationen. In Blau und in Rot sind zwei verschiedene Ansätze für Elektroden gezeigt. Die Aktivierung der Elektroden mittels Licht führt zur Erzeugung elektrischer Spannung, die entweder auf die Bipolarzellen (blaue Elektrode) oder auf die Ganglionzellen (rote Elektrode) übertragen wird.

Das Einschleusen neuer Gene mittels viraler Vektoren (Gentherapie) führt zur Veränderung des Erbguts und kann somit nicht rückgängig gemacht werden. Sollte es also zu unvorhersehbaren Nebenwirkungen kommen, gibt es kein Zurück mehr, und andere oder neuere Therapeutika sind für die Zukunft ebenfalls ausgeschlossen oder zumindest in ihrer Anwendung deutlich limitiert.

Irreversibilität trifft auf die elektronischen Implantate nicht direkt zu, aber es gibt eine Reihe von anderen Schwierigkeiten. Für nicht biologisches Material ist der menschliche Körper eine anspruchsvolle Umgebung. Die Implantate unterliegen nicht nur der Korrosion, sondern auch Immunantworten, Entzündungen und Vernarbung des Gewebes im Auge können nicht ausgeschlossen werden.

Photopharmakologie

In meiner Dissertation habe ich einen rein pharmakologischen Ansatz zur Wiederherstellung des Sehvermögens verfolgt, für den die oben genannten Herausforderungen nicht gelten. Im Labor von Professor Trauner arbeiten wir an photochromen Liganden (PCLs). Dies sind kleine Moleküle, die aus einem Pharmakophor und einer lichtschtbaren Gruppe bestehen. Der Pharmakophor ist eine funktionelle Gruppe, beispielsweise ein Kaliumkanalblocker, wie Tetraethylammonium (TEA), oder ein Rezeptorligand, wie Glutamat. Die Selektivität des PCLs hängt also davon ab, welcher Pharmakophor chemisch an die lichtschtbare Gruppe angehängt wurde (Abbildung 3 B, C; Pharmakophor - oranger Ball, lichtschtbare Gruppe - rot). So kann zum Beispiel ein PCL mit einem Glutamatrest nur glutamaterge Rezeptoren aktivieren und ein PCL mit einem TEA-Rest ausschließlich Kaliumkanäle blockieren.

PCLs können in zwei Formen existieren, in der dunkel-adaptierten, thermodynamisch stabilen *trans*-Konfiguration oder in der weniger stabilen *cis*-Konfiguration. Mit Licht bestimmter Wellenlängen kann zwischen den beiden Konfigurationen hin- und hergeschaltet werden (Abbildung 3). Durch die Veränderung der Konfiguration wird so mittels Licht die Wirksamkeit gegenüber dem Rezeptor verändert. Dieser Prozess ist vollständig reversibel und ausschließlich abhängig von der Wellenlänge des eingestrahnten Lichts. Diesen Ansatz bezeichnen wir als Photopharmakologie.

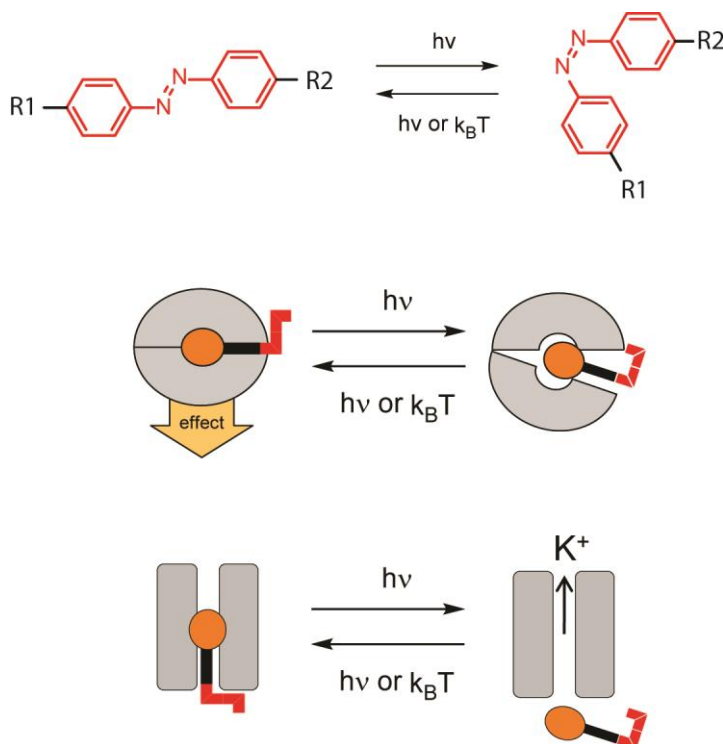


Abbildung 3: Konzept der Photopharmakologie

Molekulare Struktur der lichtsensitiven Gruppe Azobenzol (rot). Die beiden Reste R1 und R2 sind zwei mögliche Seiten für das Anbringen funktioneller Gruppen, z.B. des Pharmakophors. Die *trans-cis*-Isomerisierung erfordert immer kürzere Wellenlängen, als die *cis-trans*-Isomerisierung. Des Weiteren kann die *cis-trans*-Isomerisierung auch thermisch stattfinden. (B, C) Schematische Darstellung des Mechanismus für einen Rezeptorliganden (B) und einen Kanalblocker (C). Das Azobenzol (rot) kann mit Hilfe bestimmter Wellenlängen zwischen zwei Konfigurationen (*trans* und *cis*) geschaltet werden. Je nach Pharmakophor (oranger Ball) bindet der photochrome Ligand in einem der Zustände an einen Rezeptor oder blockiert einen Ionenkanal.

DAD: Ein photochromer Ligand zur Heilung von Blindheit

Das Ziel vieler Forschergruppen ist es, speziell die Bipolarzellen in einer degenerierten Netzhaut durch Licht zu aktivieren. Dieser Ansatz beruht darauf, dass, je näher der künstliche Lichtstimulus am originalen Wirkort, d.h. den Photorezeptorzellen, gesetzt wird, er umso mehr dem Natürlichen entspricht. Normalerweise wird der Stimulus von den Photorezeptorzellen an die Bipolarzellen weitergegeben, die wiederum das Signal an Ganglionzellen übertragen. In diesem Signalprozess finden sich viele weitere Verschaltungen, die bei einer direkten Aktivierung der Ganglionzellen, und somit dem Übergehen der Bipolarzellen, verloren gingen.

In meiner Forschungsarbeit habe ich den PCL Diethylamin-Azobenzene-Diethylamin (DAD) untersucht, der genau den oben beschriebenen erwünschten Effekt erzielt. Mit Hilfe elektrophysiologischer Messungen auf Multielektroden-Arrays (MEA) konnte gezeigt werden, dass DAD in der Lage ist, Licht- sowie Licht-aus-Antworten in einer eigentlich blinden Netzhaut von Mäusen zu erzeugen (Abbildung 4).

Dieser Stimulus ist ähnlich den natürlichen Lichtantworten einer gesunden Netzhaut. MEA-Messungen beruhen auf den elektrischen Potenzialen, die von den Ganglionzellen der Netzhaut erzeugt werden. Diese Potenziale können an der Außenseite der Zelle gemessen werden und werden als *spikes* bezeichnet. Jeder *spike*, der außen an der Zelle gemessen wird, repräsentiert ein Aktionspotenzial im Inneren der Zelle. Diese Aktionspotenziale sind die elementaren Informationsträger des Nervensystems. Da in Ganglionzellen alle Informationen der Netzhaut integriert werden, können durch das Auslesen ihrer Aktionspotenziale Rückschlüsse auf die Aktivität aller individuellen Zelltypen gezogen werden. Nach weitreichenden pharmakologischen und elektrophysiologischen Experimenten konnte gezeigt werden, dass DAD fast ausschließlich auf Bipolarzellen wirkt und somit dem Ideal zur Wiederherstellung des Sehvermögens entspricht, da es das Maximum des verbliebenen Netzwerkes reaktiviert.

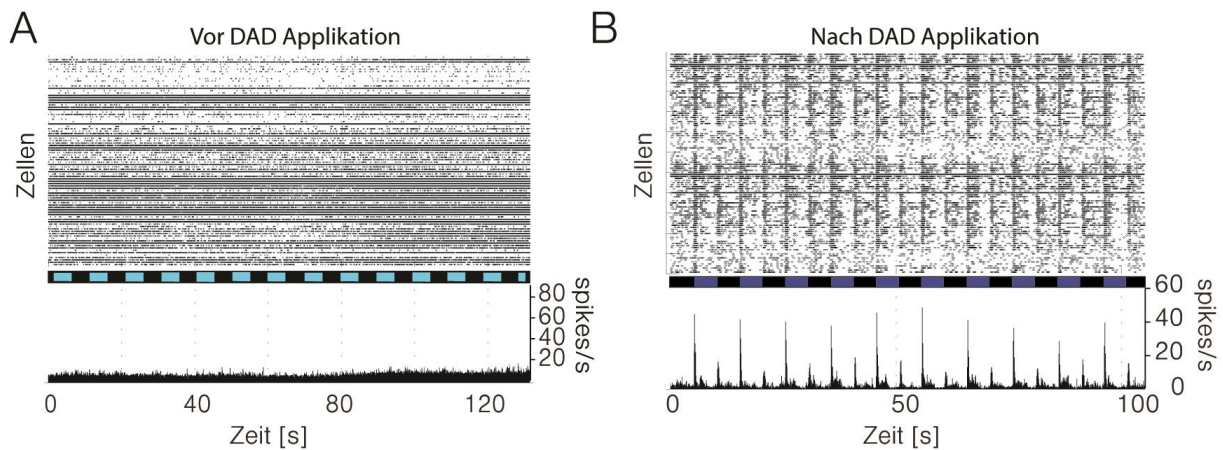


Abbildung 4: DAD erzeugt Lichtantworten in blinden Maus-Netzhäuten

(A) Rasterplot und Histogramm einer MEA-Aufnahme vor der Applikation von DAD. Der Lichtstimulus ist in der Mitte als blau-schwarzer Balken dargestellt. Schwarz bedeutet kein Licht, blau bedeutet, blaues Licht wurde appliziert. Im Rasterplot repräsentiert jede horizontale Linie die Aktivität einer gemessenen Ganglionzelle. Das Histogramm zeigt die Gesamtaktivität über alle gemessenen Zellen. Vor der DAD-Applikation ist im Histogramm deutlich zu erkennen, dass keine lichtabhängige Aktivität vorhanden ist. (B) Rasterplot und Histogramm derselben Netzhaut nach der Inkubation mit DAD. Transiente Lichtantworten werden deutlich bei Licht-an sowie Licht-aus.

Des Weiteren konnten wir zeigen, dass DAD ausschließlich in degenerierenden Netzhäuten seine Wirkung entfaltet. Dieses Ergebnis hat den großen Vorteil, dass das Molekül frühzeitig appliziert werden könnte, selbst wenn die Netzhaut noch nicht vollständig erblindet ist. Somit wäre die verbleibende natürliche Aktivität unbeeinflusst, wohingegen degenerierte Areale bereits mit Lichtantworten durch DAD versorgt würden.

Nach erfolgreichen Experimenten *ex-vivo*, d.h. im expandierten Gewebe, muss im nächsten Schritt in Richtung Anwendbarkeit beim Menschen gezeigt werden, dass es auch im lebenden Tier (*in-vivo*) funktioniert. Hierfür haben wir DAD in den Auginnenraum der blinden Mäuse appliziert. Unter anderem konnten wir in einem Verhaltensversuch zeigen, dass nach einmaliger Injektion die blinden Mäuse bis zu 12 Stunden lang in der Lage sind, Licht wahrzunehmen. Hierbei führen die hohe Löslichkeit des Moleküls und die damit verbundene gute Distribution im Auginnenraum zu einer sehr einheitlichen Verteilung von DAD in der Netzhaut.

In Zusammenarbeit mit Arbeitsgruppen an der University of Washington in Seattle und der University of Pennsylvania in Philadelphia arbeiten wir derzeit an weiteren präklinischen Studien. Diese Studien sind nicht nur notwendig, um die Sicherheit des Moleküls zu untersuchen, sondern sollen auch zeigen, dass es auch in anderen Tiermodellen als dem der Maus funktioniert. Diese Studien sind unbedingt notwendig, damit unerwünschte Nebeneffekte weitgehend ausgeschlossen werden können, bevor man den Wirkstoff an blinden menschlichen Patienten testet.

Unsere Herausforderungen

Kein Forschungsansatz ist perfekt. Wie auch die anderen Strategien auf diesem Forschungsgebiet, so hat auch die Photopharmakologie mit einigen Herausforderungen zu kämpfen. DAD ist ein kleines Molekül und sehr gut löslich; das bedeutet aber auch, dass es schnell aus dem Gewebe wieder ausgewaschen wird. Multiple Augeninjektionen wären begrenzt möglich, sind aber kein Mittel der Wahl. Des Weiteren müssen PCLs Licht absorbieren, um ihre Funktion entfalten zu können. Das heißt aber, sie absorbieren auch Licht, wenn sie nicht an ihrem Wirkort sind, sondern auch im Auginnenraum. Dadurch wird die Lichtintensität, die tatsächlich auf die Netzhaut trifft, stark verringert.

Aus diesen Gründen werden derzeit verschiedene Applikationsansätze untersucht, die erlauben sollen, eine einmalige Injektion in ein Reservoir zu geben, das dann über einen längeren Zeitraum DAD freisetzen wird. Mehrfachinjektionen werden somit so gering wie möglich gehalten, und es könnte verhindert werden, dass zu viel Licht bereits im Auginnenraum absorbiert wird, noch bevor es auf die Netzhaut trifft.

Trotz aller Herausforderungen, die in diesem Projekt auf uns warten, hat DAD herausragende positive Eigenschaften. Zum einen ist die kurze Lebensdauer von Wirkstoffen in ersten klinischen Versuchen von großem Vorteil, da im Falle unerwünschter Nebeneffekte die Therapie in sehr kurzer Zeit beendet werden kann. Zum anderen hat die vollständige Reversibilität zur Folge, dass, sobald neuere Generationen von Wirkstoffen auf den Markt kommen sollten, die Therapie mit dem besseren Molekül fortgesetzt werden könnte.

Sollte sich zudem auch im menschlichen Gewebe der Effekt bestätigen, dass DAD nur in degenerierter Netzhaut funktioniert, bietet das die Möglichkeit, frühzeitig mit einer Therapie zu beginnen, ohne gesunde Netzhautareale zu beeinflussen. Des Weiteren ist die Applikation in den Auginnenraum bereits ein Routineeingriff in der Augenheilkunde und stellt die Ärzte bezüglich der Anwendung vor keine neuen Herausforderungen.

Fazit

DAD ist das vielversprechendste von mehreren Molekülen, die derzeit für die Wiederherstellung des Sehvermögens getestet werden. Die ersten toxikologischen Daten zeigen keinerlei Auffälligkeiten, die physiologischen Eigenschaften sind nahezu optimal und die Anwendung einfach. Derzeit arbeiten wir

intensiv an möglichen Langzeit-Applikationsmöglichkeiten und versuchen, die Wirksamkeit auch in anderen Tiermodellen zu bestätigen.

Auf dem Weg zu klinischen Studien haben wir noch einige Hürden zu nehmen, sehen dem aber zuversichtlich entgegen und arbeiten mit Experten auf allen Gebieten zusammen: immer mit dem Ziel vor Augen, blinden Menschen ein Großteil ihrer Unabhängigkeit zurückgeben zu können und sie die Welt neu sehen zu lassen.