

Photosynthetische Gentherapie

Photosymbiose – neuartige Anwendungen in der Biomedizin

MYRA N. CHÁVEZ^{1,3}, BENEDIKT FUCHS², JÖRG NICKELSEN¹

¹ MOLEKULARE PFLANZENWISSENSCHAFTEN, DEPARTMENT BIOLOGIE I, LMU MÜNCHEN

² ABTEILUNG FÜR HANDCHIRURGIE, PLASTISCHE CHIRURGIE UND ÄSTHETISCHE CHIRURGIE AM KLINIKUM DER LMU MÜNCHEN

³ INSTITUT FÜR ANATOMIE, UNIVERSITÄT BERN, SCHWEIZ

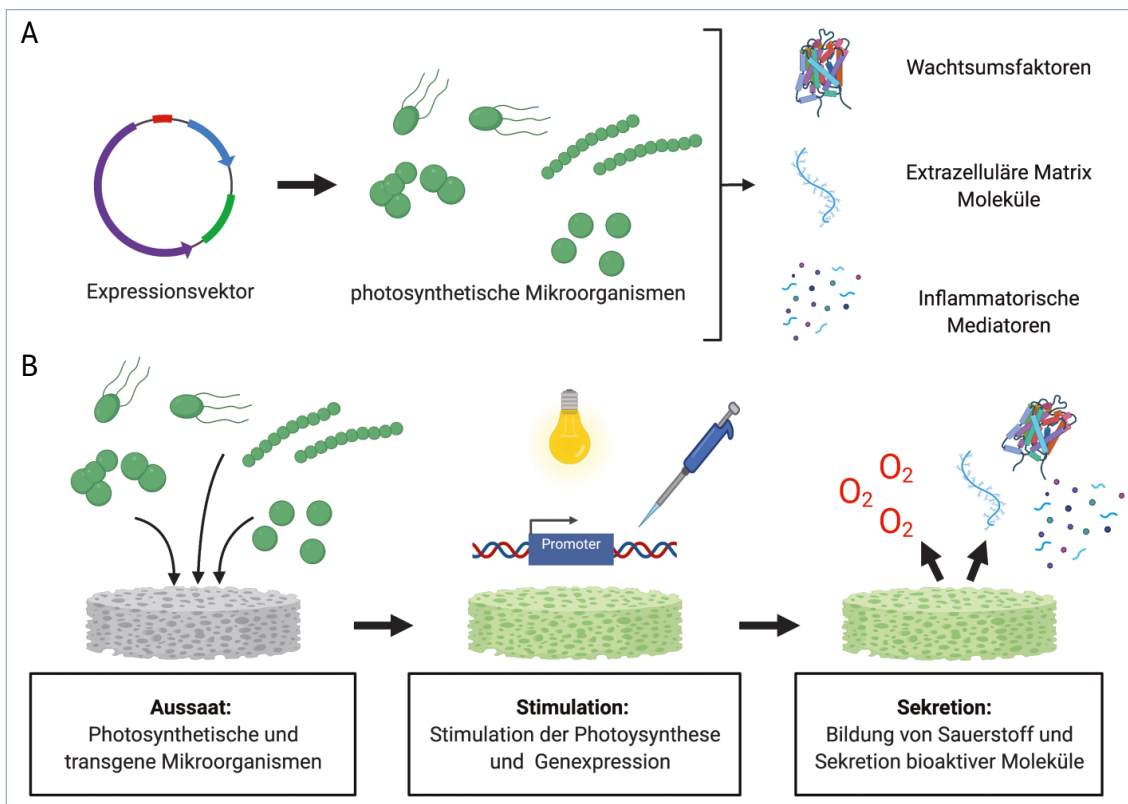
We have recently proposed a novel strategy named *photosynthetic tissue engineering* to overcome clinical problems due to hypoxia. The idea is based on transgenic photoautotrophic microorganisms that produce oxygen and at the same time secrete functional recombinant proteins into tissues. In particular, the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* has successfully been used to boost the regenerative potential of several biomedical devices, such as dermal scaffolds and surgical sutures.

DOI: 10.1007/s12268-021-1550-3

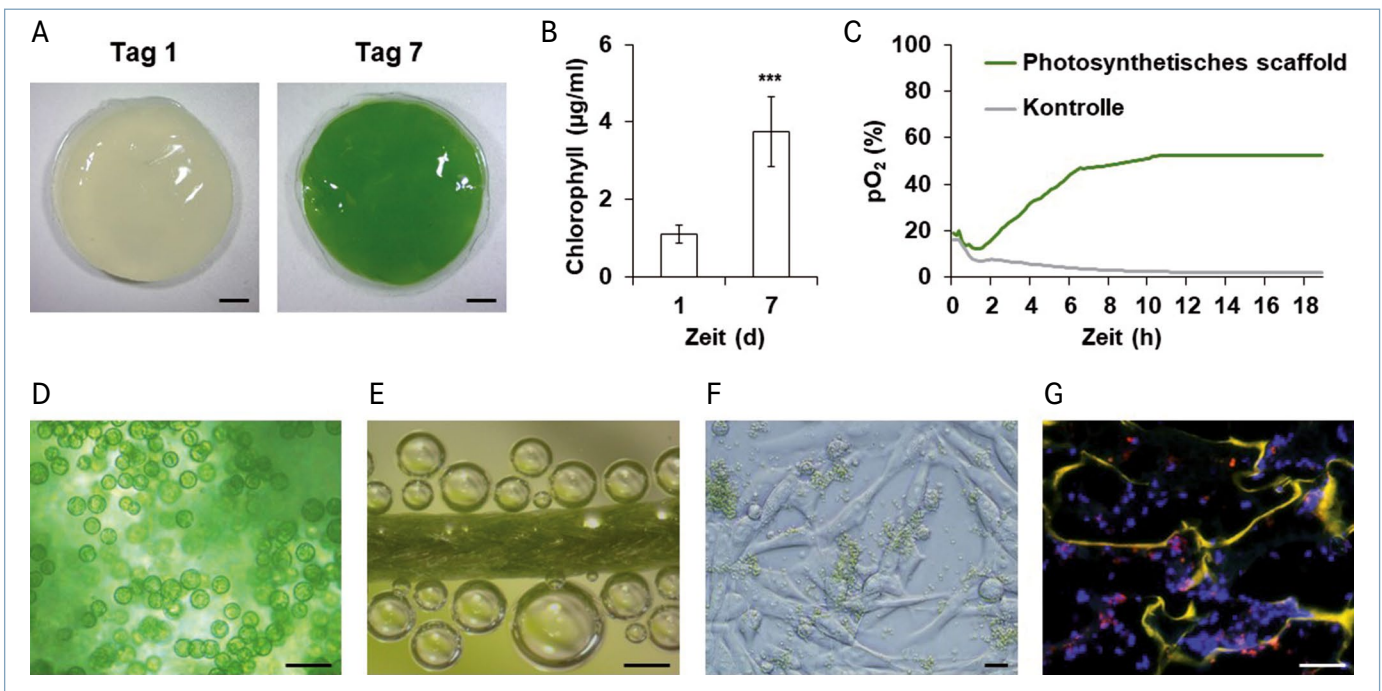
© Die Autoren 2021

■ Mit der Entstehung der oxygenenen Photosynthese vor ca. 2,5 Milliarden Jahren hat sich die Geosphäre und in der Folge die Biosphäre der Erde entscheidend verändert. Die

Umwandlung solarer Energie in Biomasse und die gleichzeitige Anreicherung des „Abfallprodukts“ Sauerstoff in der Atmosphäre ermöglichte die evolutionäre Entwicklung von Atmung und damit alle höheren Lebensformen. Trotz der universellen Verfügbarkeit des biogenen, molekularen Sauerstoffs als finaler Elektronenakzeptor der mitochondrialen respiratorischen Elektronentransportkette ist Sauerstoffmangel ein ernstes Problem für tierische Gewebe einschließlich des Menschen. Da die Diffusionsrate für Sauerstoff in Gewebe extrem gering ist, hängt seine Zufuhr unmittelbar vom kardiovaskulären Blutsystem ab, dessen Schädigung zu hypoxischen Zuständen bis hin zu Nekrosen führen kann. Dieses Szenario findet sich beispielsweise nach Gewebetransplantationen oder im Fall chronischer Wunden, wie sie bei Diabetes, massiven Brandverletzungen und bei nicht vaskularisierten Biomaterialien für Wundbehandlungen auftreten.



◀ **Abb. 1:** Allgemeines Prinzip der photosynthetischen Gentherapie. **A**, Photosynthetische Organismen, wie Mikroalgen oder Cyanobakterien, werden mit menschlichen Transgenen genetisch modifiziert, sodass sie rekombinante Biomoleküle wie Wachstumsfaktoren, Zytokine und extrazelluläre Matrixmoleküle produzieren und sekretieren können. **B**, Diese transgenen photosynthetischen Zellen können dann in biomedizinischen Geräten – wie künstlichen Gewebersatzstoffen oder chirurgischen Nähten – ausgesät werden und dienen der Abgabe von Sauerstoff und bioaktiven Molekülen an das Zielgewebe.



▲ **Abb. 2:** Photosynthetisches *tissue engineering*. **A**, Photosynthetische Organismen können in Fibrin-Kollagen-Gerüsten wachsen, die zur Rekonstruktion von Hautgewebe verwendet werden. **B–D**, Die zunehmende Menge an Chlorophyll im Gerüst (**B**) und die Freisetzung von Sauerstoff unter hypoxischen Bedingungen (**C**, $pO_2 \leq 1\%$) belegen die Fähigkeit dieser Organismen, sich unter Lichteinwirkung im photosynthetischen Gerüst (**D**) biokompatibel zu vermehren. **E**, In ähnlicher Weise können Mikroalgen in chirurgische Nähte ausgesät werden und sowohl Sauerstoff als auch rekombinante menschliche Wachstumsfaktoren bis zu 14 Tage lang konstant freisetzen. **F–G**, Ihre Biokompatibilität mit Säugetierzellen wurde sowohl *in vitro* (**F**) als auch *in vivo* (**G**) nachgewiesen, wobei Mauszellen (blau, DAPI) und Mikroalgen (rot, Chlorophyll) 7 Tage nach der Implantation in unmittelbarer Nähe zu sehen sind. Maßstabsbalken repräsentieren 0,25 cm in **A**, 25 µm in **D**, 500 µm in **E** und 100 µm in **F** und **G**.

Im Rahmen unserer aktuellen Arbeiten verfolgen wir einen neuartigen Ansatz, um Hypoxien direkt im betroffenen Gewebe zu behandeln. Die grundlegende Idee besteht im Einsatz von photosynthetischen Mikroorganismen, wie etwa Mikroalgen oder Cyanobakterien, die in die fraglichen Gewebe durch *tissue engineering* eingebracht werden und damit eine Sauerstoffzufuhr unabhängig vom vaskulären System gewährleisten [1]. Die Algenzellen werden dafür in biokompatible technische Gewebeersatzstoffe (*scaffolds*) ausgesät (**Abb. 1**), die routinemäßig zur Förderung der Wundheilung und Geweberegeneration eingesetzt werden (**Abb. 2**). Grundvoraussetzung für einen solchen Einsatz im tierischen/menschlichen Fremdgewebe ist eine schwache antigene Wirkung der Mikroorganismen. Tatsächlich läßt sich im Mausmodell belegen, dass die einzellige Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* effizient Sauerstoff in dermalen Geweben produziert und dabei verschiedene Entzündungsmarker nicht erhöht sind, weil eine starke Immunantwort des tierischen Organismus ausbleibt [2, 3]. In einem zweiten Schritt versuchen wir nun, nicht nur Sauerstoff, sondern gleichzeitig Geweberegenera-

tion-fördernde, bioaktive Moleküle durch die Algenzellen in den Wundbereich einzubringen. Als Alternative zur konstitutiven lokalen Applikation von Wirkstoffen basiert dieses Konzept der „photosynthetischen Gentherapie“ auf genetisch veränderten Algenlinien, die entsprechende humane Wirkstoffe synthetisieren und danach in den extrazellulären Raum sekretieren (**Abb. 1**).

Einzellige photosynthetische Mikroalgen haben aufgrund ihrer intrinsischen autotrophen Eigenschaften und der umfangreichen Liste verfügbarer molekularer Werkzeuge, die eine genetische Manipulation ermöglichen, ein bemerkenswertes Potenzial als Plattformen für die Produktion rekombinanter Proteine. Zu den Vorteilen zählen die kostengünstige und umweltfreundliche Anzucht von Algen, ihre schnellen Wachstumsraten und vor allem ihr GRAS-Status (allgemein als sicher angesehen), der ihre Verwendung ohne das Risiko einer Übertragung von Krankheitserregern garantiert. Darüber hinaus ermöglicht die Produktion von Biomolekülen in eukaryotischen Mikroalgen im Vergleich zur Verwendung von Bakteriensystemen eine verbesserte posttranslationale Proteinmodifikation, wodurch die

Funktionalität rekombinanter Proteine unterstützt wird. Schließlich macht die Optimierung des extrazellulären Sekretions-Targetings den Reinigungsprozess kostengünstiger und unkomplizierter, aber vor allem ermöglicht es die lokale Zufuhr von rekombinanten Proteinen in betroffene Gewebe. Die Eignung photosynthetischer Mikroorganismen für genetische Manipulationen und ihre gut etablierten Transformationsprotokolle ermöglichen so eine Vielseitigkeit des Produkt-Targetings, da sie lediglich die Entwicklung eines transgenen Stamms erfordern, um die Herstellung eines bestimmten Produkts zu ermöglichen. Hier haben sich photosynthetische Algen als fähig erwiesen, rekombinante Proteine wie Zytokine, Wachstumsfaktoren und andere vielversprechende bioaktive Moleküle – wie etwa extrazelluläre Matrixmoleküle – zu produzieren [4].

Einschränkungen der photosynthetischen, biotechnologischen Plattformen stellen jedoch die erzielbaren rekombinanten Proteinausbeuten dar, die etwa 10–1000-mal niedriger liegen als bei Verwendung bakterieller Systeme. Unsere aktuellen Arbeiten zielen daher darauf ab, die optimale Kombination der effizientesten verfügbaren Expres-

sionsvektoren, Stämme und Transformationsprotokolle zu identifizieren, die die Fähigkeit von transgenen *C. reinhardtii*-Zellen verbessern, um humane rekombinante bioaktive Wachstumsfaktoren zu produzieren und zu sekretieren [5]. So zeigt sich z. B., dass die Aussaat eines genetisch veränderten *C. reinhardtii*-Stamms, der so konstruiert wurde, dass er den menschlichen vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor VEGF-165 (hVEGF) konstitutiv in dermale Kollagen-Scaffolds sekretiert, die Migration von Endothelzellen sowie die Bildung von Blutgefäßen *in vivo* induziert [3]. Darüber hat die kombinatorische Anwendung von drei transgenen Stämmen, die jeweils einen anderen pro-angiogenen Wachstumsfaktor (hVEGF, hPDGF-B und hSDF-1) sekretieren, sogar einen potenzierenden Effekt auf angiogene menschliche Endothelzellen [5]. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass durch Kombinationen von transgenen Stämmen, die bestimmte bioaktive Moleküle sekretieren, komplette zelluläre Heilungsmechanismen – wie etwa die komplexe Angiogenese – gemäß den Bedürfnissen des Patienten oder spezifischen therapeutischen Zielen wirksam unterstützt werden können.

Das Potenzial transgener photosynthetischer Organismen für die Herstellung definierter Therapeutika kann neben dem dermalen *tissue engineering* aber auch für andere biomedizinische Anwendungen genutzt werden. Zum Beispiel können transgene Mikroalgen aufgrund ihrer geringen Größe auch in resorbierbare chirurgische Nähte eingebracht werden, um die Wundheilung unmittelbar nach dem Verschluss zu fördern. Solche photosynthetischen Wundnähte sind in der Lage, signifikante Mengen an biofunktionellen rekombinanten Wachstumsfaktoren über einen Zeitraum von 14 Tagen kontinuierlich zu sekretieren und dabei erhebliche Mengen an Sauerstoff bei Belichtung freizusetzen (**Abb. 2**, [6]).

Sowohl die Liste der in photosynthetischen Mikroorganismen produzierten rekombinanten Proteine als auch die Liste neuer biotechnologisch nutzbarer Mikroalgen wächst jedes Jahr stetig an. Diese vielversprechende Entwicklung wird es voraussichtlich in der Zukunft ermöglichen, die Vorteile verschiedener photosynthetischer Systeme, z. B. im Hinblick auf die Lichtnutzung, mit der Produktion von rekombinanten Wirkstoffen zu kombinieren und optimale Linien für viele gewünschte photosynthetische Gentherapie-Anwendungen bereitzustellen. Entscheidend ist, dass diese Entwicklungen mit Studien einhergehen, die die Biokompatibilität der fraglichen Organismen mit menschlichem Gewebe bewerten und ihre sichere Verwendung in biomedizinischen Anwendungen validieren. Ein Beispiel hierfür ist der Cyanobakterienstamm *Synechococcus sp. PCC 7002*, der als sicherer Wirt für biotechnologische Anwendungen gilt, da die Immunogenität seiner Lipopolysaccharide relativ gering ist. Kürzlich wurde *Synechococcus sp. PCC 7002* genetisch verändert, um einen Stamm zu erzeugen, der Hyaluronsäure produzieren und sekretieren kann, wodurch nun eine lebensfähige und vorteilhafte Alternative zu anderen, weniger sicheren Hyaluronsäure-Produktionsprozessen besteht [7].

Schließlich könnten photosynthetische biomedizinische Ansätze angepasst werden, um auf andere spezifische zelluläre Prozesse im Zusammenhang mit der Wundheilung sowie Fibrose, chronische Entzündung und *de-novo*-Gewebebildung abzielen. Bei Erfolg würde die photosynthetische Gentherapie jeden Schritt des Geweberegenerationsprozesses unterstützen und somit zu einer alternativen Therapie für die chronische Wundbehandlung sowie viele andere Erkrankungen im Zusammenhang mit Gewebephypoxie werden. ■

Literatur

- [1] Hopfner U, Schenck TL, Chávez MN et al. (2014) Development of photosynthetic biomaterials for *in vitro* tissue engineering. *Acta Biomater* 10: 2712–2717
- [2] Schenck TL, Hopfner U, Chávez MN et al. (2015) Photosynthetic biomaterials: a pathway towards autotrophic tissue engineering. *Acta Biomater* 15: 39–47
- [3] Chávez MN, Schenck TL, Hopfner U et al. (2016) Towards autotrophic tissue engineering: Photosynthetic gene therapy for regeneration. *Biomaterials* 75: 25–36
- [4] Chávez MN, Moellhoff N, Schenck TL et al. (2020) Photosymbiosis for biomedical applications. *Front Bioeng Biotechnol* 8: 577204
- [5] Jarquín-Cordero M, Chávez MN, Centeno-Cerdas C et al. (2020) Towards a biotechnological platform for the production of human pro-angiogenic growth factors in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Appl Microbiol Biotechnol* 104: 725–739
- [6] Centeno-Cerdas C, Jarquín-Cordero M, Chávez MN et al. (2018) Development of photosynthetic sutures for the local delivery of oxygen and recombinant growth factors in wounds. *Acta Biomater* 81: 184–194
- [7] Zhang L, Selão T, Nixon P, Norling B (2019) Photosynthetic conversion of CO₂ to hyaluronic acid by engineered strains of the cyanobacterium *Synechococcus sp. PCC 7002*. *Algal Research* 44: 101702

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>.



Myra N. Chávez, Benedikt Fuchs und Jörg Nickelsen (v. l. n. r.)

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Jörg Nickelsen
 Molekulare Pflanzenwissenschaften
 Biozentrum
 LMU München
 Grosshaderner Straße 2-4
 D-82152 Planegg-Martinsried
 joerg.nickelsen@lrz.uni-muenchen.de