

Dominik Niopek: Steuermann von Proteinen

„Dann hätten wir eine Art Plug-and-Play-Baukasten.“

Dominik Niopek behauptet, die Biologie sei die potentiell mächtigste Disziplin der Ingenieurwissenschaften. Aber er behauptet das nicht nur. Er ist auch auf dem besten Weg, diese Behauptung zu beweisen. „Mein Ziel ist es, Zellen in ihrem Verhalten präzise zu kontrollieren oder gar zu steuern“, sagt Niopek. Eine Kontrolle dient vorwiegend der Forschung. „Ich kontrolliere einen bestimmten zellulären Prozess und beobachte, zu welchem Ergebnis er führt, so dass ich etwas darüber lerne.“ Eine Steuerung dagegen ist schon anwendungsbezogen, sie lenkt das Verhalten der Zelle in eine bestimmte Richtung und erreicht damit einen gewünschten Zustand, so wie man ein Auto zu einem bekannten Ziel fährt. Als Werkzeuge dieser Kontrolle, als Motoren dieser Steuerung bedient sich Dominik Niopek naturgemäß der Proteine. Denn sie sind die Stabilisatoren wie die Spielmacher des Lebens. Sein Stammgebiet ist die Optogenetik, die sich die Eigenschaft photosensorischer Proteine zunutze macht, in ihrem Verhalten auf Lichtimpulse zu reagieren. Davon ausgehend, hat er spezielle Proteine konstruiert, die sich durch Licht oder Arzneimittel so steuern lassen, dass er damit den Vorgang der Genomeditierung nach Belieben kurzfristig ein- oder ausschalten kann. Wie sehr seine konstruktiven Fähigkeiten als synthetischer Biologe geschätzt werden, zeigt sich daran, dass er zum Sommersemester 2023 auf den Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie an die neugegründete Fakultät für Ingenieurwissenschaften der Universität Heidelberg berufen wurde, wohin er von der TU Darmstadt zurückgekehrt ist.

Mutig auf ein neues Feld

Die Grundlagen der Optogenetik waren 1971 mit der Entdeckung gelegt worden, dass die Ionenpumpe Bacteriorhodopsin durch Licht aktiviert werden kann. Vier Jahrzehnte lang blieb diese Entdeckung dann in der Schublade wissenschaftlicher Erkenntnis liegen, bis 2003 der Ionenkanal Channelrhodopsin-2 (ChR2) aus Grünalgen isoliert wurde. Dieser Ionenkanal öffnet sich, wenn blaues Licht auf die Alge fällt: So kann sie sich optimal zur Sonne hin ausrichten, woher sie die Energie für die

Photosynthese bezieht. Nachdem es drei Jahre später gelungen war, das Gen für ChR2 in einen Fadenwurm und Nervenzellen aus Ratten zu transplantieren, nahm die Optogenetik einen schnellen Aufschwung. Denn die Nervenzellen ließen sich nun allein durch Bestrahlung mit blauem Licht so stimulieren, dass sich seine Muskeln zusammenzogen und er sich in gewünschte Richtungen fortbewegte. So eröffnete sich generell die Möglichkeit, ohne chemische Stimuli, Berührungsreize oder invasive Methoden in natürliche Prozesse einzugreifen. Folgerichtig wählte die Fachzeitschrift *Nature Methods* die Optogenetik 2010 zur Methode des Jahres. Damals war Dominik Niopek in seinem Studium der Molekularen Biotechnologie in Heidelberg gerade dabei, über seine bevorstehende Masterarbeit nachzudenken. Mutig entschied er sich für ein Thema aus dem neuen Feld der Optogenetik. Er fand daran so viel Gefallen, dass er der Optogenetik in seiner anschließenden Doktorarbeit in der Abteilung für Bioinformatik des Deutschen Krebsforschungszentrums unter Leitung von Roland Eils nicht nur treu blieb, sondern darin die Entwicklung des Feldes auch deutlich vorantrieb.

Optimal genutzte Freiheit

Schon der Bachelorstudent Dominik Niopek war Roland Eils positiv aufgefallen. Hatte er doch 2008 zu seinem erstem Studententeam beim *international Genetically Engineered Machine* (iGEM)-Wettbewerb gehört, der am Massachusetts Institute of Technology ausgetragen wurde, und viel zu dessen Erfolg beigetragen. Deshalb nahm Eils Niopek als Doktoranden an, obwohl die Optogenetik für seine Abteilung völlig neu war. Niopek sei von Anfang an voll verantwortlich für seine Projekte gewesen, sagt Eils, „von der kreativen Planung über die experimentelle Implementierung bis zur Datenanalyse“. Und Niopek betont, dass er in Roland Eils einen Mentor gefunden habe „der aus einer übergeordneten Perspektive auf meine Projekte draufschauen konnte und mir von Beginn an maximale Freiheit für meine Forschung gelassen hat“. Niopek wusste die Freiheit zu nutzen: Die Ergebnisse seiner Doktorarbeit mündeten in zwei Top-Publikationen in *Nature Communications* - und das aus gutem Grund.^{1 2} Denn der Doktorand hatte die optogenetische Steuerung erstmals für den intrazellulären Transport von Proteinen zwischen Cytoplasma und Zellkern genutzt.

Ein Werkzeug für die Forschung

Dafür verwendete er das lichtempfindliche Protein LOV aus der Haferpflanze, das ein Teil von deren Sonnenlicht-Sensor Phototropin ist. „LOV ist bei Dunkelheit kompakt und starr, ändert seine Struktur bei Lichteinfall aber so stark, dass es sich dabei stellenweise entfaltet“, erklärt Niopek. „Dank seiner geringen Größe und Flexibilität

eignet es sich hervorragend zur Steuerung von Proteinen.“ Um die Machbarkeit seines Konzeptes nachzuweisen, verknüpfte Niopek LOV zunächst mit einer Art Adressaufkleber, der es dem natürlichen Transportsystem der Zelle als wichtiges Frachtgut für den Zellkern empfahl. Das gentechnisch derart etikettierte Protein koppelte er wiederum an ein rot fluoreszierendes Reporterprotein. Bestrahlte er die Zellen, in denen er diese Vorbereitungen getroffen hatte, nun mit blauem Licht, dann setzte darin umgehend ein Protein-Shuttle vom Cytosol in den Zellkern ein. Binnen weniger Sekunden färbte sich der Zellkern rot. Von diesem *Proof of Concept* ausgehend, gelang es Niopek, statt des Reporterproteins wichtige Transkriptionsfaktoren wie p53 oder NFκB mit dem modifizierten LOV-Etikett zu versehen. Beleuchtete er die Zellen nun mit blauem Licht, starteten sie genetische Reparaturprogramme oder teilten sich. „Für die Forschung in Zellkulturen und Modellorganismen ist diese Methode zu einem wichtigen Werkzeug geworden“, sagt Niopek. „Für eine lichtgesteuerte Krebstherapie beim Menschen eignen sie sich aber noch längst nicht.“

Lichtschalter für die Genomeditierung

Nachdem Niopeks Doktorarbeit dessen wissenschaftliche Brillanz bestätigt hatte, bot Roland Eils ihm 2016 eine Stelle als Nachwuchsgruppenleiter für Synthetische Biologie an. In der Zwischenzeit hatte ein Verfahren der Genomeditierung seinen Siegeszug durch die Labore der Welt angetreten, das den zuvor angewandten Verfahren mit Zinkfinger- und TALE-Nukleasen in seiner Simplizität, Genauigkeit und Kostenwürdigkeit weit überlegen war. Es basierte auf der zielgenauen Verschickung der Nuklease Cas9 zu einer beliebig definierbaren Stelle der DNA. 2015 war es vom Fachmagazin *Science* zum *Breakthrough of the Year* ernannt worden. Emmanuelle Charpentier und Jennifer Doudna hatten dieses CRISPR-Cas genannte Verfahren 2012 aus der Taufe gehoben, indem sie sich ein bakterielles Abwehrsystem gegen Viren (Bakteriophagen) zum Vorbild nahmen. Gegen die bakteriellen Cas-Genscheren wiederum wehren Viren sich mit Hilfe von anti-CRISPR-Proteinen. „Als ich mein eigenes Labor in Heidelberg aufbaute, waren gerade die ersten Paper zu diesen viralen Inhibitoren von Cas-Nukleasen erschienen“, erinnert sich Dominik Niopek. Und bald schon wusste er diese Neuigkeiten in eine bemerkenswerte Innovation umzusetzen. Er konstruierte nämlich zusammen mit seinem Team lichtschaltbare anti-CRISPR-Proteine, in einem Ansatz, für den er das sprechende Akronym CASANOVA wählte (CRISPR-Cas activity switching by a novel, optogenetic variant of anti-CRISPR proteins).³ Als schaltbaren Photorezeptor wählte er wiederum das LOV-Protein aus der Haferpflanze. „Schaltbare anti-CRISPR-Proteine lassen sich mit allen

CRISPR-Editoren kombinieren, die es gibt“, sagt Niopek.“ Abhängig davon, welche Zellen einer Kultur oder eines Gewebes man beleuchte, kann man Genomeditierungen damit lokal präzise begrenzen. Therapeutisch könnte es dadurch eines Tages möglich sein, genau festzulegen, in welchen Zellen eine CRISPR-Cas-Nuklease wirken soll. „Bei Patienten mit genetischen Erkrankungen der Haut und besonders der Netzhaut ließe sich dann beispielsweise das Genom ausschließlich durch Lichtsteuerung ausschließlich dort editieren“, erläutert Niopek. Prinzipiell sei eine solche Steuerung aber auch durch Kopplung mit Rezeptoren für Botenstoffe möglich, die spezifisch für einen bestimmten Zelltyp sind. Auf solche Art könnte in Zukunft vielleicht sogar erblich verursachter Muskelschwund behandelt werden.

Plug and Play mit Proteinen

Relevanter als die präzise Lokalisation erscheint Niopek aber die zeitliche Differenzierbarkeit genomischer Eingriffe dank schaltbarer Nukleasen. Vor allem für Forschungszwecke. So kooperiert er etwa mit einem Neurowissenschaftler in Lausanne, der ein Gen gefunden hat, das vermutlich im Prozess des Lernens eine wichtige Rolle spielt. Ihm liefert Niopek nun ein optogenetisches Werkzeug, mit dem er dieses Gen in Mäusen zu beliebigen Zeitpunkten schnell ein- oder ausschalten kann. Dadurch lässt sich eventuell herausfinden, in welcher Phase des Lernprozesses dieses Gen aktiv sein muss. Er selbst sei auf der Ebene der Grundlagenforschung aber weniger daran interessiert, wie Zellen funktionieren, sagt Niopek. Sein Hauptinteresse sei es vielmehr, Prozesse zu steuern, indem er die daran beteiligten Proteine präzise beeinflusse. „Ich will das, was wir mit anti-CRISPR-Proteinen gemacht haben, auf alle möglichen anderen Proteine übertragen.“ Das ist leichter gesagt als getan, denn derzeit dauert es ein bis zwei Jahre, bis es einem Doktoranden gelingt, einen gut funktionierenden anti-CRISPR-Schalter zu bauen. „Es wäre fantastisch, wenn wir das aufskalieren könnten“, sagt Niopek. „Dann hätten wir eine Art Plug-and-Play-Baukasten für schaltbare Proteine.“

Eine vielversprechende Kombination

Auf dem Weg zu diesem Baukasten kam das mit dem Life Sciences Bridge Award der Aventis Foundation verbundene Preisgeld für Dominik Niopek zur richtigen Zeit. Er konnte damit seine Gruppe erweitern und aufwändige Versuchsreihen starten. Darin fahndet er nach einem Ansatz, Proteine so zu verändern, dass sie über bestimmte Domänen allosterisch unkompliziert zu schalten sind. Dieser Ansatz ist so erfolgversprechend, dass ihm dafür ein *ERC Starting Grant* zugesprochen wurde. Er kombiniert maschinelles Lernen mit gelenkter Evolution. Selbst wer an einem Protein

nur fünf Aminosäuren systematisch verändern will, hat dafür 20^5 , also 3,2 Millionen Möglichkeiten. Auch mit Hilfe intelligentester Rechner ist es also ungeheuer schwierig, ein Protein durch vorgeplante Eingriffe so zu verändern, dass es gewünschte Eigenschaften annimmt. Einfacher wird es, wenn man sich die natürliche Evolution mit ihrem Wechselspiel von Zufall und Auswahl zum Vorbild nimmt. Für den Zufall sorgen Niopek und sein Team durch Mutationen in dem Gen des Proteins, das sie verändern wollen, zum Beispiel durch eine vorsätzlich fehlerhaft ausgeführte Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Aus der Vielzahl der Mutanten stellt eine Hefe oder ein Bakterium anschließend eine entsprechende Vielzahl veränderter Proteine her. Diese werden im Hochdurchsatz-Screening auf ihre Eigenschaften überprüft. Die besten werden ausgewählt, die sie codierenden Gene isoliert und in den nächsten Kreislauf von Zufallsmutation und Selektion geschickt. So wird nach vielen Wiederholungsrunden ein Protein mit gewünschten Eigenschaften gefunden. „Üblicherweise wäre man bei diesem Prozess vor allem am Endergebnis interessiert, aber das ist häufig suboptimal“, sagt Niopek. „Genauso spannend ist für uns, was während der Evolutionsrunden passiert, welche Proteine sich darin aus welchem Grund an- und abgereichert haben.“ Folglich füttert er alle Daten, die in seinen gelenkten Evolutionsexperimenten entstehen, in künstliche neuronale Netzwerke ein, die zuvor auf Millionen verschiedener Proteinsequenzen trainiert worden waren und viel über Proteine „wissen“. So hofft er, maschinell Muster zu erkennen, die sich dem experimentellen Blick nicht offenbaren. Das könnte dazu führen, dass sich der Evolutionsprozess im Computer nachstellen ließe. „Dann würde der Rechner uns für jedes schaltbare Protein, das wir für Grundlagenforschung oder Anwendung brauchen, ein Herstellungsrezept anbieten können.“

Autor: Joachim Pietzsch, Wissenswort

¹ Niopek D, Benzinger D, Roensch J, Draebing T, Wehler P, Eils R and Di Ventura B (2014): Engineering light-inducible nuclear localization signals for precise spatiotemporal control of protein dynamics in living cells. *Nature Communications*. 5. doi:10.1038/ncomms5404

² Niopek D, Wehler P, Roensch J, Eils R and Di Ventura B (2016): Optogenetic Control of Nuclear Protein Export. *Nature Communications*. 7. doi: 10.1038/ncomms10624

³ Bubeck F, Hoffmann MD, Harteveld Z, Aschenbrenner S, Bietz A, Waldhauer MC, Börner K, Fakhiri J, Schmelas C, Dietz L, Grimm D, Correia BE, Eils R[®] and Niopek D[®] (2018): Engineered anti-CRISPR proteins for optogenetic control of CRISPR/Cas9. *Nature Methods*. 15(11):924-927. doi.org/10.1038/s41592-018-0178-9