

Einleitung

Das elektrische Cochleaimplantat ist die zur Zeit erfolgreichste Neuroprothese mit über 400.000 implantierten Patienten weltweit. Es ermöglicht den meisten von ihnen ein offenes Sprachverstehen. Allerdings haben die Patienten mit einem Cochleaimplantat Schwierigkeiten hinsichtlich des Sprachverstehens in Umgebungsgeräuschen, der Wahrnehmung von Klangfarbe der Sprache und auch von Musik. Dies liegt im Wesentlichen an der schlechten Frequenzauflösung aktueller Cochleaimplantate, welche durch das große elektrische Feld der Elektroden (Abb. 1a) bedingt ist.

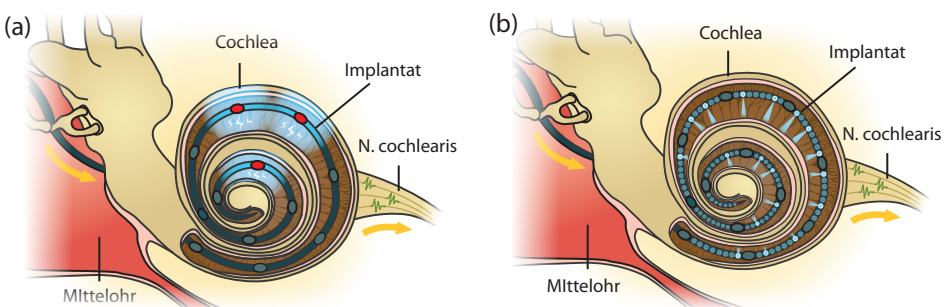


Abb. 1: Schema der Cochlea mit eingebrachtem elektrischem (a) und optischem (b) Implantat.

Unser Ziel ist es, diese Defizite mit einem optogenetischen Ansatz zu überwinden. Durch eine genetische Modifikation von Spiralganglienneuronen (SGN) lassen sich diese optisch erregen. Da Licht besser fokussierbar ist, verspricht das optische Cochleaimplantat eine bessere räumliche Auflösung der cochleären Stimulation (Abb. 1b), und damit mehr unabhängige Stimulationskanäle sowie eine erhöhte Frequenzauflösung der Schallkodierung.

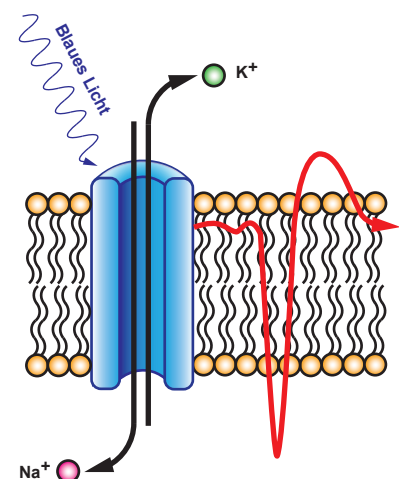


Abb. 2: Schema eines Kanalrhodopsins in der Zellmembran: Aktiviert durch blaues Licht führt der Kationenstrom durch viele Kanäle zu einem Aktionspotential.

Kanalrhodopsine sind durch Licht aktivierbare Ionenkanäle. Chronos ist ein für Licht im blauen Bereich (um 470 nm) sensibler Kationenkanal (Abb. 2), der im Vergleich zu anderen Kanalrhodopsinen eine besonders schnelle Kinetik besitzt. Durch das Einbringen von Chronos in die SGN-Membran erwarten wir physiologische Aktionspotentialraten (200 - 400 Hz) durch eine optische Stimulation erreichen zu können.

Referenzen:

- [1] Hernandez, V. H. et al. Optogenetic stimulation of the auditory pathway. J. Clin. Invest. 124, 1114–1129 (2014).
- [2] Klapoetke, N. C. et al. Independent optical excitation of distinct neural populations. Nat. Methods 11, 338–346 (2014).

Danksagungen:

Diese Arbeit wurde durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (Bernstein Focus für Neurotechnologie, Antrag 01GQ0810, T. M., V. H. H. und MED-EL Deutschland) sowie durch die Deutsche Forschungsgesellschaft im Rahmen des Exzellenzclusters 117 (Mikroskopie im Nanometerbereich und Molekularphysiologie des Gehirns, FZT 103, S. K., T. S. und T. M.) gefördert. M. J. wurde durch MED-EL Deutschland und C. W. durch die Georgius Agricola Stiftung Ruhr (Institut für Pathologie, Ruhr-Universität Bochum) gefördert.

Methoden

Virusvermittelter Gentransfer: Das Einbringen der Kanalrhodopsin-DNA in SGN wurde über ein Adeno Assoziiertes Virus (AAV-2/6-Kombination) vermittelt. Die Expression wurde über den Humanen-Synapsin-1-Genpromotor kontrolliert und Chronos an einen eGFP-Reporter gekoppelt (Abb. 3a). Die Transfektion erfolgte einerseits als transuterine Mikroinjektion (Abb. 3b) der AAV in die Otozyste von 11,5 bis 12,5 Tage alten Embryonen einer schwangeren CD1-Wildtyp Maus. Andererseits wurden die AAV in die linke Cochlea adulter mongolischer Rennmäuse injiziert (Abb. 3c). Es wurde stets die linke Seite injiziert, die rechte diente als Kontrolle. Bei beiden Methoden wurden die Tiere mittels Isofluran inhalativ anästhesiert sowie mittels Buprenorphin und Carprofen (s. c. Injektion) analgisiert.

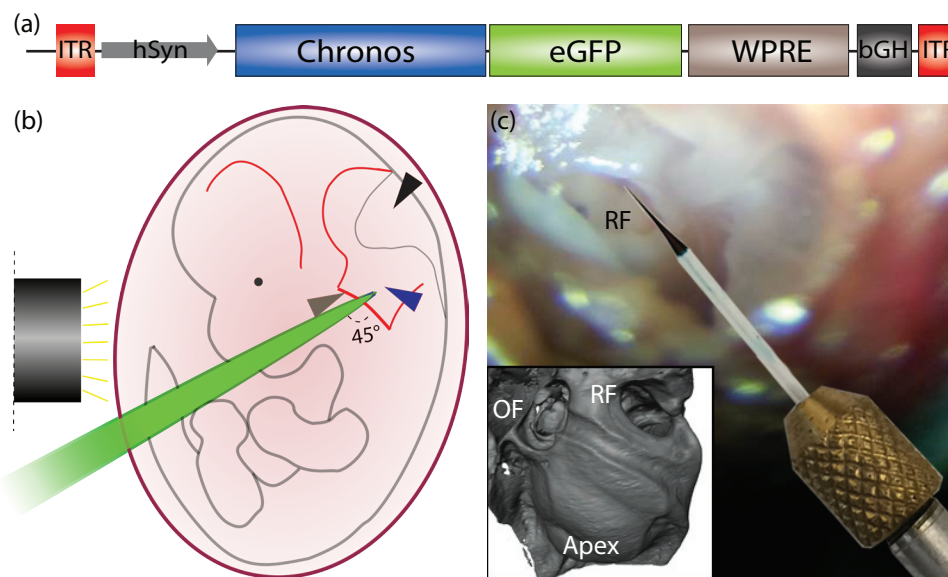


Abb. 3: Virusvermittelter Gentransfer: (a) Verwendetes DNA-Konstrukt. Transuterine (b) und postnatale Mikroinjektion (c). Abkürzungen: RF = Rundes Fenster, OF = Ovale Fenster.

Optisch evozierte Hirnstammpotentiale: An den virustransduzierten Tieren wurde nach 4 - 6 wöchiger Inkubationszeit überprüft, ob sich mittels optischer Stimulation der Cochlea Hirnstammpotentiale ableiten ließen. Hierzu erfolgte erneut eine Anästhesie (Urethan + Xylazin) und Analgesie (Buprenorphin) der Tiere mit anschließender Lagerung auf einer Heizplatte (37°C) in einer schallisolierten Kammer. Die optische Stimulation erfolgte mit einer optischen Faser (50 µm), die an einen 473 nm Laser (MBL473, 100 mW DPSS; Chanchun) gekoppelt und über das runde Fenster in die Cochlea eingeführt wurde. Die Hirnstammpotentiale wurden mit einem speziell entwickelten Verstärker zwischen Vertex und Mastoid (s. c. Nadelelektroden) abgeleitet.

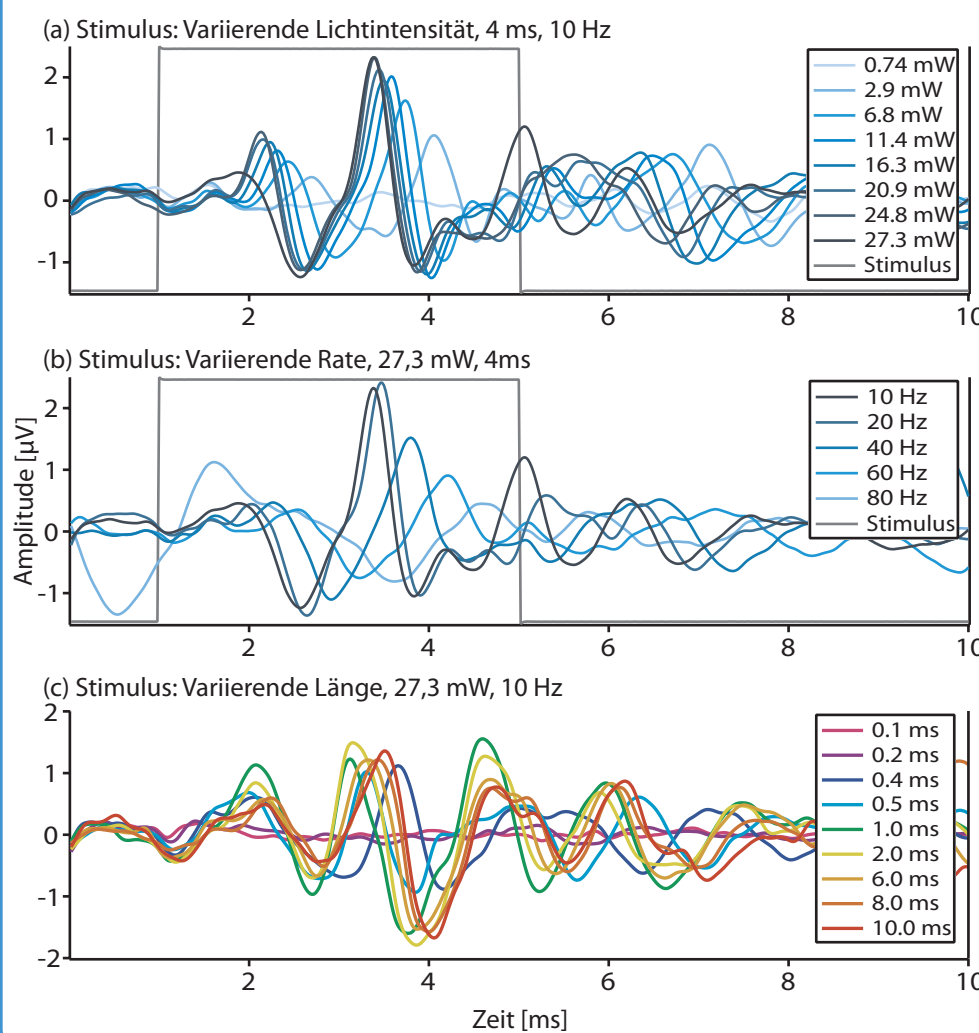
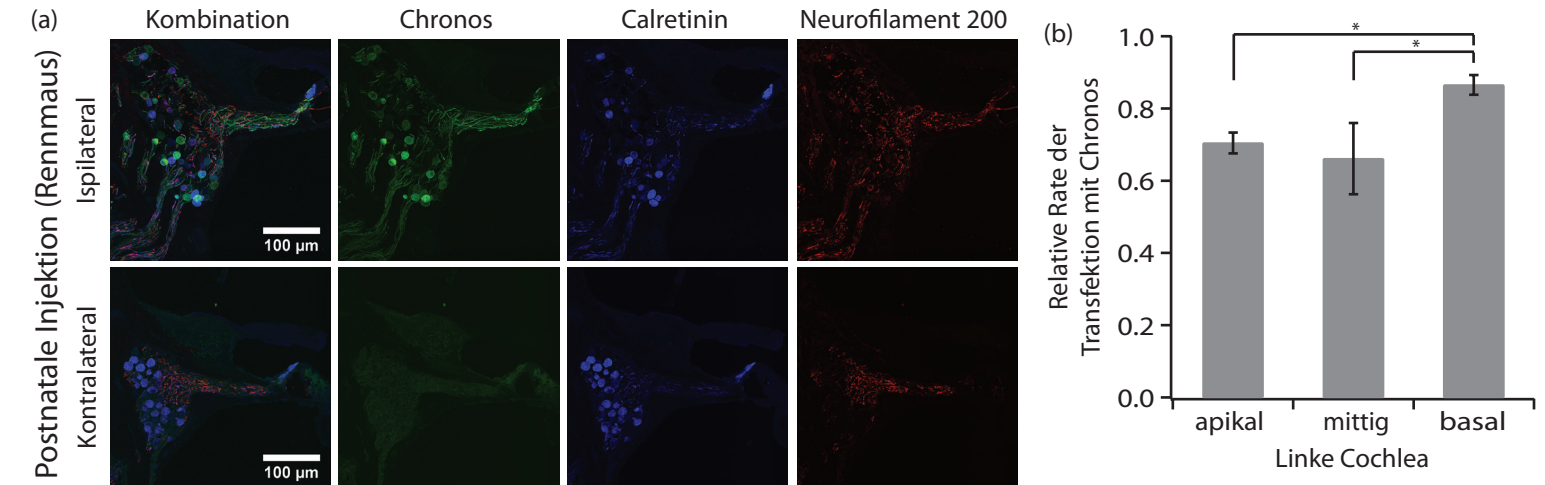
Ableitungen aus dem primären auditorischen Kortex: Die Versuchsbedingungen entsprechen denen der optisch evozierten Hirnstammpotentiale. Zur Ableitung von Potentialen aus dem primären auditorischen Kortex wurde die Kalotte an entsprechender Stelle entfernt und eine Wolframelektrode ca. 300 µm tief in diesem positioniert.

Immunhistochemische Analysen: Die Immunhistologie wurde mit herkömmlichen Methoden an Kryoschnitten der dekalzifizierten Cochleae jedes Versuchstiers durchgeführt. Zur Aufnahme der Bilder diente ein konfokales Mikroskop (Leica TCS SP5), die Auswertung wurde mittels Image J durchgeführt.

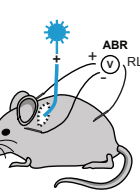
Ergebnisse

Ergebnis 1 - Immunhistochemie:

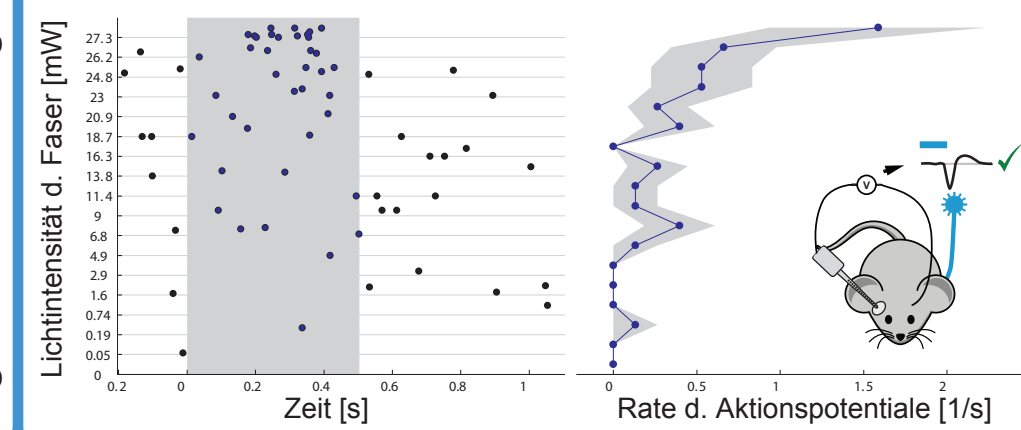
Die immunhistologische Analyse der Cochleae ((a) beispielhaft linke (oben) und rechte (unten) mittlere Windung eines Tieres) von 5 erfolgreich transfizierten Rennmäusen zeigte in der gesamten Cochlea hohe Raten transfizierter SGN von 66 - 89 % (b). Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.



Ergebnis 2 - Hirnstammpotentiale: Bei der optischen Stimulation der Cochlea einer transuterin mit Chronos injizierten Maus zeigten sich spezifische Antworten in den Ableitungen von Hirnstammpotentialen. Variierende Lichtintensität (a) sowie Stimulusrate (b) führten zu Änderungen in Latenz und Amplitude der Antwort. Ab einer Stimuluslänge von 0,4 ms (c) konnte eine reliable Antwort abgeleitet werden.



Ergebnis 3 - Ableitungen aus dem primären auditorischen Cortex: Die optische Stimulation der linken Cochlea einer transuterin mit Chronos injizierten Maus (Tier aus Ergebnis 2) aktiviert den kontralateralen primären auditorischen Cortex. Der Dotplot (links) zeigt Aktionspotentiale (Punkte), gemessen mittels Einzelneuronableitung, abhängig von der Lichtintensität am Ausgang der optischen Faser (der graue Bereich entspricht der Stimuluslänge).



Schlussfolgerung und Ausblick

AAV vermittelter Gentransfer erlaubt in Nagern eine effiziente Expression von Chronos, einem schnellen Kanalrhodopsin, welches Spiralganglienneurone für blaues Licht empfindlich macht.

Die cochleäre Stimulation transduzierter Nagern mit Licht der Wellenlänge 473 nm führt zu einer Aktivierung des auditorischen Systems.

Zukünftige Experimente mit **Multikanal-µLED-Cochleaimplantaten** werden zeigen, inwieweit sich Frequenz- und Intensitätsauflösung durch die optische Stimulation der SGN verbessern lassen.

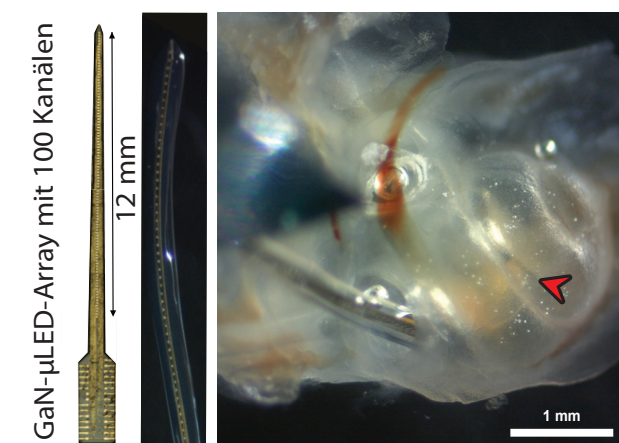


Abb. 4: Die Abbildung zeigt ein Multikanal-µLED-Implantat mit ca. 100 Kanälen auf 12 mm Länge (links), welches mit Silikon eingefasst wurde (mittig) und über das runde Fenster in eine Maus Cochlea eingeführt werden konnte (rechts). Das Implantat deckte die Basilarmembran über eine Strecke von 6 mm ab, was einer Frequenzbreite von 5,5 - 86 kHz in der Maus entspricht (Hörbereich ca. 1 - 86 kHz). Roter Pfeil = Implantatsspitze.