

Nobelpreis für einen Grenzfall

von Olaf Spörkel

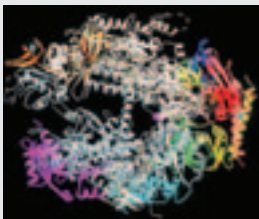


In dieser Titelgeschichte über molekulare Bildgebung geht es unter anderem um Bilder, die für das Auge zunächst gar nicht existieren. Einige von ihnen basieren nicht einmal auf Licht, sondern auf mechanischen Kräften

oder quantenmechanischen Wechselwirkungen zwischen Atomen. Erst ein Computer, der die Signale hochempfindlicher Sensoren in Pixel umrechnet und die unzähligen Daten bündelt, kann aus den Informationen Bilder von beeindruckender Detailgenauigkeit im molekularen oder atomaren Maßstab konstruieren. Licht, wie unsere Augen es wahrnehmen, wäre nicht in der Lage, solch feine Strukturen abzubilden, da die Wellenlänge bei weitem nicht ausreicht, um atomare Dimensionen aufzulösen.

Auch der diesjährige Nobelpreisträger für Chemie, Roger Kornberg von der Stanford University School of Medicine, hätte seine Erkenntnisse ohne solche Computertechnologien nicht gewinnen können. Er lieferte einen detaillierten Einblick in die molekularen Strukturen eines Enzyms, das genetische Erbinformation in biologische Funktion übersetzt - die RNA Polymerase II.

Bei den farbigen Molekülbildern, die er 2001 in der Fachzeitschrift *Science* publizierte, handelt es sich allerdings um rein theoretische Modelle, die auf einer visuellen Rekonstruktion kristallographischer Röntgensignale basieren. Die Informationen für die dreidimensionalen Abbildungen erhielt Kornberg mit einer Methode, die auch schon für die Strukturaufklärung der DNA eingesetzt wurde: Bei dieser Technik werden Röntgenstrahlen in Abhängigkeit des Kristallgitters der Probe charakteristisch gebeugt. Der



Computermodell der RNA-Polymerase

atomare Aufbau des Kristalls errechnet sich dann aus dem beobachteten Beugungsmuster.

Kornbergs Bilder kann man somit als Grenzfall zwischen der molekularen Bildgebung, wie sie in dieser Titelgeschichte vorgestellt wird, und dem Computerdesign, das wir z.B. aus der Wettervorhersage kennen, betrachten; ein Grenzfall, der das Credo „ich glaube nur, was ich sehe“ so manches aufgeklärten Zeitgenossen ins Wanken bringen könnte.

Molekulare Bildgebung

Ansichten aus dem Innersten der Zelle

Der Begriff molekulare Bildgebung umfasst zwei unterschiedliche Fachgebiete: Während die medizinische Grundlagenforschung mit Laserlicht und Quantenmechanik in die Zellen vordringt, macht die klinische Diagnostik mit Signalmolekülen pathologische Prozesse auf makroskopischer Ebene sichtbar. Was die beiden Bereiche verbindet, sind vor allem faszinierende Bilder.

Wer mit dem Mikroskop in subzelluläre Strukturen vordringen möchte, gelangt rasch an Grenzen, die durch die Wellenlänge des sichtbaren Lichts von etwa 400 bis 800 nm (Nanometer) gesetzt werden. Ganze Zellen mit einem Durchmesser von 1/10 bis 1/100 Millimeter sowie deren Organellen wie der Zellkern oder größere Membrankompartimente lassen sich gut auflösen, doch viele Bakterien, Viren oder gar Moleküle liegen um zwei bis vier Zehnerpotenzen darunter im Nanometerbereich und sind so nicht darstellbar.

In der Elektronenmikroskopie (EM) werden Oberflächen oder Raumstrukturen mithilfe von beschleunigten Elektronen abgebildet, die nach Ablenkung mit elektromagnetischen Linsen auf einen Projektionsschirm treffen. Aufgrund der sehr viel kürzeren Wellenlänge gelangt man in Auflösungsbereiche von 0,1 nm, so dass sich Einzelmoleküle abbilden lassen. Allerdings ist mit der Darstellung biologischer Präparate, die strahlenempfindlich sind, ein hoher methodischer Aufwand verbunden, bei dem das Probenmaterial häufig in Mitleidenschaft gezogen wird. Insbesondere ist es durch die nötige Fixierung unmöglich, biologische Vorgänge in einer Zelle zu verfolgen.

1981 entdeckten die Physiker Gerd Binnig und Heinrich Rohrer im IBM

Forschungslabor in Rüschlikon in der Schweiz einen abstandsabhängigen „Tunnelstrom“, der das Reich der Moleküle und sogar Atome für die Bildgebung erschloss. Sie erhielten dafür 1986 den Nobelpreis in Physik. Ein Tunnelstrom tritt immer dann auf, wenn eine elektrisch leitende Spitze in geringem Abstand über ein ebenfalls leitendes Untersuchungsobjekt gefahren wird. Eigentlich dürfte dabei kein Stromfluss auftreten, doch bei Abständen in atomaren Größenordnungen überlagern sich die quantenmechanischen Zustände der Elektronen von Oberfläche und Spitze, was zu einem Tunnelstrom führt. Diesen kann man messen und indirekt über die Abstände die Oberflächenstruktur des Objekts berechnen.

Das Rasterkraftmikroskop (engl. atomic force microscope, AFM) nützt eine Variante des Tunnelstromprinzips, mit der man auch nichtleitende biologische Materialien in atomarer Auflösung darstellen kann. Hier tastet eine Spitze die Oberfläche der Probe mechanisch ab. Man detektiert mithilfe eines reflektierten Laserstrahls jede Auslenkung der Spitze: Je rauher die Oberfläche, desto stärker ist die Auslenkung.

Ein Computer baut – wie bei allen hier vorgestellten Verfahren - die Informationen zu einem Bild zusammen. Die Auflösung liegt bei 0,1 bis 10 nm, für eine Fläche von bis zu 0,1 mm Kantenlänge benötigt man rund 10 Minuten. Mit diesem Rasterverfahren können z.B. atherosklerotische Plaques oder Alzheimer-Fibrillen sichtbar gemacht werden.

Da Messungen auch unter physiologischen Bedingungen in wässrigem Milieu möglich sind, findet die AFM vor allem in der forschenden Biologie und Medizin sehr attraktive Anwendungsmöglichkeiten. Ein Einsatz in der Routinediagnostik



Die Abbildung zeigt eine menschliche Hautzelle, die auf einer Glasoberfläche gewandert ist. Rot gefärbt sind Oberflächenproteine (Integrine), das Zell-„Skelett“ aus stabilisierenden Proteinfasern (Aktinfilamente) leuchtet grün. (Foto: Dr. Gregor Kirfel, Univ. Bonn)

ist noch nicht absehbar. Vom Preis her ist diese Technologie allerdings durchaus erschwinglich. Ein einfaches Rasterkraftmikroskop ist bereits für 20.000 Euro zu haben, man kann auch bis zu einer halben Million Euro für ein vollautomatisches System mit Probenvorbereitung ausgeben. Das Kompetenzzentrum Nanoanalytik an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster hat sogar eine Anleitung zum Eigenbau eines Tunnelmikroskops inklusive Software entwickelt (<http://sxm4.uni-muenster.de>). Für weniger als 800 Euro Materialkosten können Bastler mit diesen Informationen ein funktionstüchtiges Gerät zusammenbauen.

Die Nahfeldmikroskopie ist eine Zwischenform von Rasterkraft- und Lichtmikroskopie. Auch hier tastet eine kleine Spitze als Sonde die Oberfläche einer Probe ab, das System detektiert aber elektromagnetische Felder, die bei Beleuchtung jedes Objekts entstehen und nicht dem Beugungslimit unterliegen.

Dres. Rainer Hillenbrand und Thomas Taubner vom MPI für Biochemie in Martinsried kombinierten ein Nahfeldmikroskop mit einer Superlinse. Sie verstärkte das Nahfeld, so dass die abzurasternde Oberfläche dichter an der Sonde ist. Mit derzeit verfügbaren Superlinsen gelangt man in Größenordnungen von 20 bis 30 Nanometer. Für die medizinische Forschung könnte diese Technologie interessant sein, um Zellmembranen an lebenden Zellen berührungsfrei scharf abzubilden.

In eine andere Welt optischer Technologien führt uns die konfokale Mikroskopie. Sie hat sich für die Analyse von meist mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten Molekülen innerhalb einer Zelle bereits etabliert. Bei der klassischen Lichtmikroskopie erreicht nicht nur das Licht aus

der Brennebene des Objektivs das Auge des Betrachters, das konfokale Mikroskop dagegen blendet das Licht, das nicht aus der Brennebene des Objektivs kommt, durch eine Lochblende aus und erzielt so wesentlich bessere Auflösungen.

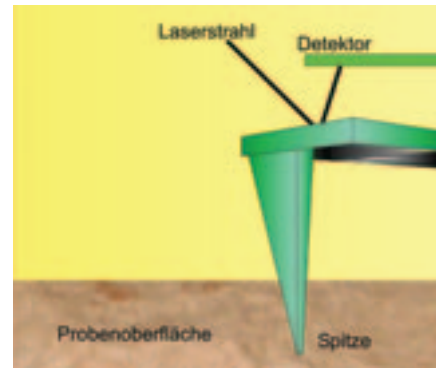
Die meisten Mikroskope dieser Art nutzen als Punktlichtquelle einen starken Laser, der das Objekt zeilenweise abscannt; durch die Lochblende wird jeweils nur ein Bildpunkt aus der Brennebene des Objektivs erfasst. Die gerasterten Punkte werden digital zu einem Bild zusammengesetzt. Während man mit konventioneller Mikroskopie dreidimensionale Strukturen häufig nur als Schleier erkennt, lassen sich mit der konfokalen Mikroskopie diese Färbungen scharf darstellen. Durch Verrechnung mehrerer Schichten kann der Computer auch dreidimensionale Gebilde zusammensetzen und so zelluläre Strukturen als Ganzes darstellen.

Basierend auf modernen Lichtmikroskopen lassen sich lebende Zellen beim Live Cell Imaging in Echtzeit beobachten. Die Systeme sind mit einer Software ausgestattet, die Mikroskop und Digitalkamera so steuert, dass über einen langen Zeitraum automatisiert Bildersequenzen aufgenommen werden können. So lassen sich z.B. Transportvorgänge oder Zellwanderungen in Zeitraster-Aufnahmen unter physiologischen Bedingungen festhalten. Unser Titelbild zeigt eine Hautzelle des Menschen, die auf einer Glasplatte wandert.

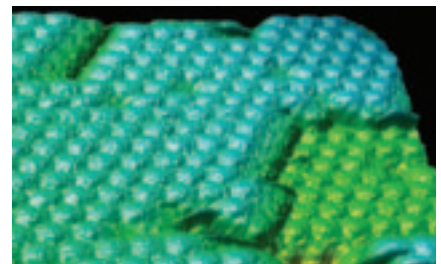
Der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) schließlich ist eine Technik, mit der man Abstände zwischen zwei Molekülen und deren räumliche Anordnung innerhalb einer Zelle bestimmen kann. Auch hier kommen Fluoreszenzfarbstoffe zum Einsatz. Im ersten Schritt wird das Donormolekül angeregt. Ist in direkter Umgebung ein Akzeptormolekül, wird die Energie strahlungsfrei transferiert. Je geringer die räumliche Entfernung der beiden Moleküle zueinander, desto stärker ist der Energietransfer und die Emission, also die Fluoreszenzintensität, des Akzeptors. Als Fluorochrome werden zunehmend Mutanten des Green Fluorescent Proteins (GFP) eingesetzt. Typische Donor/Akzeptor-Paare sind z.B. EBFP/EGFP oder ECFP/EYFP.

Häufig wird die Fluoreszenzmikroskopie auch zur Bestimmung der Ca-Konzentration innerhalb einer Zelle oder eines Kompartimentes herangezogen. Voraussetzung hierfür sind fluoreszenzmarkierte Marker, die unterschiedliche Emissionsmaxima in Ca-freien und Ca-gebundenen Zustand aufweisen und damit ihre Fluoreszenzeigenschaften mit der Ca-Bindung ändern. ■

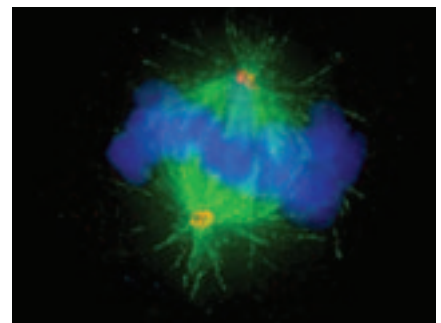
os, gh



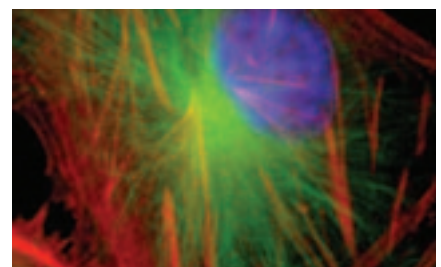
Das Rasterkraftmikroskop tastet mit einer feinen Spitze die Probenoberfläche ab und detektiert Unebenheiten von atomarer Größe.



Aus den gewonnenen Daten errechnet ein Computer das Bild. Hier zu sehen sind ca. 100 dicht gepackte Viruspartikel.



Die Fluoreszenzmikroskopie macht zelluläre Strukturen oder ganze Prozesse sichtbar. (Aufnahme einer sich teilenden Zelle; Bild: Max-Planck-Institut für Biochemie).



Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahme eines Zytoskeletts einer Epithelzelle. Die Mikrotubuli sind grün, Aktin rot, die DNA ist blau markiert. (Bild: Steve Rogers).

Hightech in der Diagnostik

Signalgebende Moleküle machen pathologische Prozesse im Körper sichtbar und weisen so den Weg zu neuen diagnostischen Verfahren, vor allem in der Onkologie, Kardiologie und Neurologie.

In der Vergangenheit musste sich die Radiologie weitgehend auf Strukturelemente wie Knochendichte oder Wassergehalt beschränken. Dynamische Tests wie die Aufnahme von radioaktiv markiertem Jod in die Schilddrüse waren eher die Ausnahme und lieferten nur wenig detaillierte Informationen. Bei der noch jungen diagnostischen Disziplin der molekularen Bildgebung geht es dagegen um die Verfolgung biochemischer Prozesse im Körper mit spezifischen Markern und hochauflösenden Techniken.

Die Idee dahinter ist einfach: Kranke Zellen haben aufgrund einer gestörten Genregulation einen veränderten Stoffwechsel oder bilden auf ihrer Oberfläche krankheitstypische Rezeptoren aus. Führt man nun signalgebende Moleküle an die entsprechenden Gewebe so heran, so dass sie von den Zellen verarbeitet werden oder an die Rezeptoren binden, so kann man die Krankheitsprozesse mit geeigneten Detektionssystemen visualisieren. Entzündungsherde, Tumoren, Ablagerungen u.v.m. werden auf diese Weise sichtbar und können mit Serienaufnahmen sogar in ihrem Entstehen oder Ansprechen auf Therapien über die Zeit verfolgt werden.

Vor allem zwei Detektionstechniken sind im Einsatz. Für die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) benützt man Positronenstrahler wie Kohlenstoff-11, Sauerstoff-15 oder Fluor-18, die kurzlebig sind und minimale Strahlenbelastung verursachen. Da diese Isotopen in einem Zyklotron erzeugt werden müssen, ist der logistische Aufwand hoch. Eine PET-Analyse kostet etwa 1.000 Euro, was den routinemäßigen Einsatz vorläufig noch auf eher wissenschaftliche Fragestellungen einschränkt. Für die preisgünstigere Single Photon Emission Computed Tomography (SPECT) werden Gamma-Strahler wie z.B. Technetium-99m oder Jod-123 mit höherem Strahlenrisiko eingesetzt.

Da beide Verfahren eine relativ geringe räumliche Auflösung haben, werden sie

häufig mit der Magnetresonanztomographie (MRT) und anderen hochauflösenden Verfahren für die Darstellung von Gewebestrukturen gekoppelt. Durch die rechnerische Überlappung von Funktions- und Strukturinformationen entstehen so Bilder mit hohem Informationsgehalt.

Milliardeninvestitionen

Medizingeräte-Hersteller wie GE und Siemens verstärken derzeit mit zum Teil Milliarden teuren Akquisitionen von Firmen aus Biochemie und Molekular-diagnostik ihr Forschungsengagement in diesem Bereich. Was die Großen der Bildgebung dabei umtreibt, ist unter anderem die Hoffnung, von den Früchten des Humangenom-Projekts ernten zu können - eine allerdings eher vage Hoffnung, wenn man die bislang magere Ausbeute der Genomforschung für den medizinischen Alltag betrachtet. Der Weg von einer genetischen Variante oder Fehlregulation bis zum krankhaften Prozess auf Zell- und Gewebeebene ist weit und in aller Regel durch Wechselwirkungen mit inneren und äußeren Umweltbedingungen äußerst verschlungen.



Mit PET (links) und SPECT (rechts) kann man molekulare Prozesse in der nuklearmedizinischen Diagnostik sichtbar machen.

Auch wenn also Schlagworte wie individualisierte Medizin und Gentherapie im Zusammenhang mit molekularer Bildgebung gern von den Medien verbreitet werden, steht der Industrie noch ein langer dorniger Weg bevor. Dass sie sich dessen bewusst ist, zeigt unter anderem die Förderung von zwei Stiftungsprofessuren durch Siemens Medical Solutions am neu gegründeten Europäischen Institut für Molekulare Bildgebung (EIMI) der Universität Münster.

In umgrenzten Teilbereichen der Kardiologie, Onkologie und vor allem Neurologie sind allerdings Erfolge zu verzeichnen: So gilt die PET-oder SPECT-Analyse der

Gewebevitalität bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit bereits als „Goldstandard“. Anfang Juni berichtete Prof. M. Schwaiger (TU München) auf der ersten Tagung der Europäischen Gesellschaft für Molekulare Bildgebung in Paris, dass sich auch die Innervierung des Herzens mit geeigneten Markern sichtbar machen und für die klinische Prognose bei Patienten mit Herzfehlern und Arrhythmien nützen lässt. Mit dem Zuckeralanalogon Fluor-18-Desoxyglucose kann man seit einigen Jahren die erhöhte Stoffwechselrate von Krebszellen sichtbar machen, um schwer zugängliche Hirntumoren oder verstreute Metastasen ab einem Durchmesser von 3 mm aufzuspiüren.

In der Neurologie macht man sich bei der Differenzialdiagnostik der Parkinson-Krankheit zunutze, dass das dopaminerge System im Mittelhirn gestört ist: Je weiter die Krankheit voranschreitet, desto mehr dopaminerge Nervenzellen gehen zugrunde, was z.B. beim klinisch schwer abgrenzbaren essenziellen Tremor nicht der Fall ist. An den Synapsen der dopaminergen Nervenzellen im Striatum findet sich sowohl ein präsynaptischer Dopamintransporter als auch ein postsynaptischer D2-Dopaminrezeptor. Für beide Moleküle gibt es selektive Jod-123-markierte Liganden (Ioflupan und Iofluprid). Mit dem ersten sieht man im SPECT bei fortschreitender Parkinson-Krankheit eine Verkleinerung der Markierung, während beim Tremor keine Änderung zu beobachten ist. Bei den so genannten Parkinson-plus-Syndromen zeigt dagegen der zweite Marker eine Verminderung, weil hier auch die postsynaptischen Zellen geschädigt sind.

Besonders intensive Aktivitäten findet man bei der Alzheimerdiagnostik, wo sich ein wirklicher Durchbruch abzeichnet. Ablagerungen von β -Amyloid im Gehirn gehen den ersten Symptomen um Jahre voraus; durch spezifische Marker für dieses pathologische Eiweiß lassen sich tatsächlich schon frühzeitig Signalvermehrungen feststellen (s. nächste Seite). Dies ist umso bedeutsamer, als es inzwischen auch therapeutische Konzepte gibt, um das Fortschreiten der Ablagerungen zu hemmen und sogar deren Auflösung zu bewirken. ■

jg

Früherkennung von M. Alzheimer

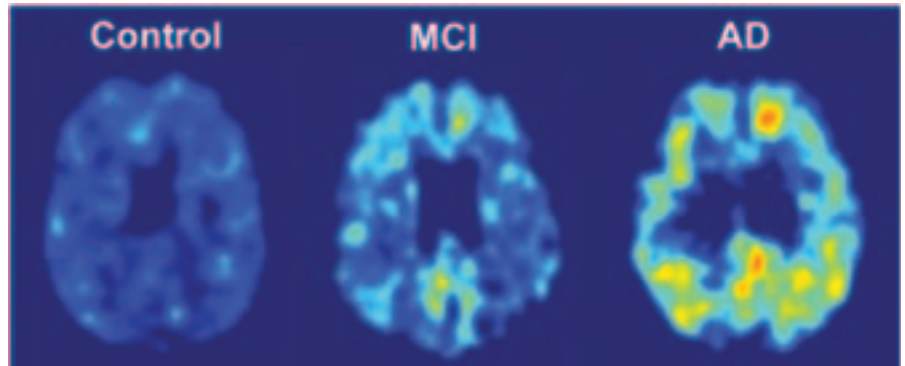
An der University of California in Los Angeles (UCLA) entwickelte die Arbeitsgruppe von Gary Small Naphthalen-Verbindungen (z.B. DDNP), die nicht nur an Amyloid-Plaques, sondern auch an Neurofibrillen, also an beide neurochemischen Charakteristika des Alzheimer-Hirns, binden. DDNP wird mit Fluor-18 markiert (FDDNP), um im PET Amyloid und Neurofibrillen sichtbar zu machen. Das Patent für FDDNP, das die UCLA hält, wurde laut Small von Siemens einlizensiert. Man warte derzeit täglich auf einen positiven Bescheid der amerikanischen Zulassungsbehörde FDA, um mit Studien zu Sicherheit und Wirksamkeit fortzufahren, die schließlich zur kommerziellen Nutzung führen sollen.

Das Verfahren ist so sensitiv, dass man damit nicht nur Patienten mit manifester Alzheimer-Krankheit von gesunden Kontrollen, sondern auch Patienten mit leichter kognitiver Beeinträchtigung (MCI), einem Frühstadium der Alzheimer-Krankheit, hochsignifikant von den beiden anderen Gruppen abgrenzen kann (obere Abb.). Werden Patienten im Zeitverlauf mehrmals untersucht, so kann man außerdem ein Fortschreiten der Demenz mit einer Zunahme der FDDNP-Markierung im PET korrelieren.

An der University of Pittsburgh haben Psychiater und Nuklearmediziner in Zusammenarbeit mit schwedischen Chemikern einen Radioliganden namens „Pittsburgh Compound B“ (PiB) entwickelt, der chemisch ein an Kohlenstoff-11 gekoppeltes Benzothiazol-Derivat darstellt. Er bindet mit hoher Affinität und Selektivität an β -Amyloid und passiert problemlos die Blut-Hirn-Schranke.

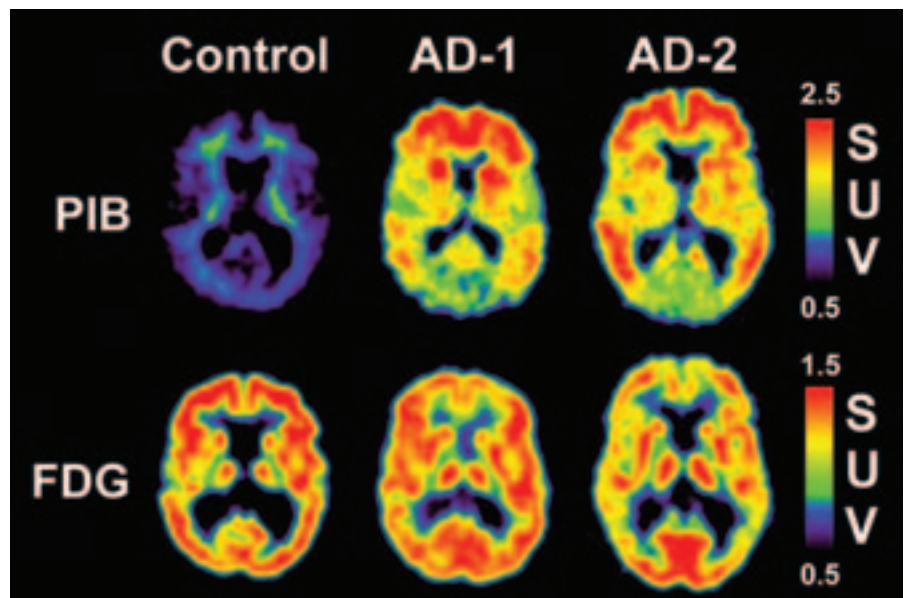
In ersten klinischen Studien zeigten Alzheimer-Patienten vor allem in Bereichen des Assoziationskortex eine wesentlich höhere Markierung als gesunde Kontrollen (untere Abb.). Am ausgeprägtesten war sie im Frontalhirn mit einer Steigerung um durchschnittlich 94%. Eine Zunahme der Signalintensität war aber auch im Parietal- und Okzipitalhirn sowie im Striatum erkennbar. Da Kohlenstoff-11 als Isotop nur eine Halbwertszeit von 20 Min. hat, wird PiB von GE Healthcare nun mit Fluor-18 für die klinische Anwendung weiterentwickelt, so Bill Klunk von der Pittsburgher Arbeitsgruppe.

Eine Studie, die zur Zulassung führen soll, wird Anfang 2007 beginnen. Ferner versuchen die Forscher, die Verbindung so zu verändern, dass sie auch mit SPECT und damit preiswerter angewendet werden kann. Auf jeden Fall, so Klunk, hat PiB einen Vorsprung vor den anderen Substanzen: Während



Positronenemissionstomografien mit ^{18}F -FDDNP von einem gesunden Probanden (links), einem Patienten mit leichter kognitiver Beeinträchtigung (MCI, Mitte) und einem Patienten mit manifester Alzheimer-Krankheit (rechts). Die FDDNP-Markierung im Kortex wurde gegen das Cerebellum als Referenzregion quantifiziert und zeigt eine deutliche Zunahme vom MCI zur Alzheimer-Erkrankung, wo alle wesentlichen Regionen des Neokortex mehr oder weniger betroffen sind.

Quelle: Vladimir Kepe, University of California at Los Angeles.



Vergleich von PiB-PET (obere Reihe) und FDG-PET (unten) eines Gesunden und zweier Patienten mit leichter Alzheimer-Demenz. Insbesondere bei Patient AD-2 ist im FDG-PET temporoparietal und frontal bereits ein deutlicher Hypometabolismus erkennbar (unten), noch viel deutlicher zu sehen ist aber bei beiden Patienten eine Akkumulation von PiB (oben).

Quelle: Univ. of Pittsburgh, Amyloid Imaging Group.

FDDNP und SB-13 (s.u.) im Augenblick nur in den Zentren angewendet werden, die sie entwickelt haben, arbeiten mit PiB mindestens 18 weitere Arbeitsgruppen außerhalb Pittsburghs.

An der University of Pennsylvania in Philadelphia schließlich wurde SB-13 (ein 4-N-Methylamino-4'-hydroxystilben) entwickelt, das sich ebenfalls in Amyloidhaltigen Regionen von Alzheimer-Gehirnen, nicht jedoch in anderen Hirngeweben anreichert. In ersten Untersuchungen an Patienten schien SB-13 eine ähnliche Nachweisempfindlichkeit für Amyloid wie PiB zu haben.

Die Suche nach Amyloid-Markern hat neben dem diagnostischen auch einen therapeutischen Aspekt: Substanzen wie DDNP beispielsweise haben mehrere Bindungsstellen auf dem Amyloid-Peptid und stören die Aggregation der Peptide zu Amyloidfibrillen. Sie haben deshalb therapeutisches Potenzial: DDNP selbst etwa ist nur in ausgesprochen hohen Konzentrationen wirksam, aber es kann ebenso wie andere Liganden als Ausgangsverbindung für die Suche nach Medikamenten dienen, die in vertretbarer Dosierung die Ablagerung von Amyloid verhindern. ■

jg