

Visualisierung biochemischer Prozesse in Säugetieren

Martin Thunemann, University of California San Diego, La Jolla, CA, USA.
Email: martin@thunemann.de

In Säugetieren und anderen vielzelligen Organismen werden biochemische Abläufe durch verschiedene Signalwege reguliert und aufeinander abgestimmt. Dieses komplexe Zusammenspiel erlaubt es dem Organismus, seinen physiologischen Status aufrechtzuerhalten und sich äußeren Einflüssen anzupassen. Fehlregulationen biochemischer Reaktionsketten können Ursache verschiedener Krankheiten sein oder mit diesen einhergehen. Es ist zwar möglich, biochemische Prozesse und ihre Regulation in einfacheren Modellsystemen zu untersuchen, jedoch lässt sich das vielschichtige Zusammenwirken mehrerer Zelltypen in Organsystemen wie dem Herz-Kreislaufsystem oder dem Gehirn oft nur unzureichend simulieren. Daher werden in der biomedizinischen Forschung zunehmend auch Methoden eingesetzt, die biochemische Prozesse im Menschen oder in Modellorganismen wie der Maus sichtbar und quantitativ erfassbar machen. Im Folgenden stelle ich meine Arbeiten mit zwei dieser Methoden vor.

Die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) ist eine Bildgebungstechnik, die in der präklinischen und klinischen Forschung sowie der klinischen Diagnostik eingesetzt wird [1]. Sie basiert auf dem Zerfall kurzlebiger Radioisotope, die als Bestandteil eines Tracermoleküls dem Patienten oder Versuchstier verabreicht werden. Basierend auf den biochemischen Reaktionen, denen die Tracermoleküle im Körper unterworfen sind, reichern sich diese in bestimmten Geweben an. Der Zerfall des im Tracermolekül gebundenen Radioisotops wird dann im PET-Scanner nicht-invasiv nachgewiesen. Die Quantifizierung der räumlichen Verteilung des Tracers im Organismus ist die Grundlage zur Bestimmung verschiedener biochemischer Parameter. Die Anwendung der PET-Methode in Mäusen ist aufgrund der kleinen Körpergröße eine große technische Herausforderung. Im Rahmen meiner Diplomarbeit bei Prof. Bernd Pichler im Labor für präklinische Bildgebung habe ich daher untersucht, ob die - zu dem Zeitpunkt modernsten - Kleintier-PET-Scanner eine quantitative Analyse des dopaminergen Systems im Maushirn erlauben. Dies würde longitudinale nicht-invasive Untersuchungen von Mausmodellen neurologischer Erkrankungen (z.B. Morbus Parkinson) ermöglichen. Es zeigte sich, dass räumliche Auflösung und Sensitivität aktueller Kleintier-PET-Scanner für Studien des dopaminergen Systems in der Maus ausreichend sind [2]. Während meiner anschließenden Promotion bei Prof. Robert Feil am Interfakultären Institut für Biochemie (IFIB) etablierte ich ein System zum PET-basierten „Cell Tracking“. Dabei werden ausgewählte Zellpopulationen mit Hilfe eines PET-Reportergens genetisch markiert. Dies geschieht unter Verwendung des Cre/lox-Rekombinationssystems, das zeit- und gewebespezifisch die Expression der Thymidinkinase (sr39tk-Mutante, [3]) aus dem Herpesvirus aktiviert. Diese phosphoryliert radioaktiv markierte Guanodin-Derivate wie den PET-Tracer [¹⁸F]FHBG, was zu dessen Anreicherung in Thymidinkinase-exprimierenden Zellen führt, die so nicht-invasiv mittels PET nachgewiesen werden können. So lässt sich das Schicksal genetisch markierter Zellen im gleichen Tier durch wiederholte PET-Messungen longitudinal verfolgen, z.B. um Wanderung, Proliferation oder Tod einer ausgewählten Zellpopulation in Tiermodellen für menschliche Erkrankungen darzustellen. Die Funktionalität dieses neuartigen Systems konnten wir anhand verschiedener Anwendungen zeigen. So verfolgten wir in Longitudinalstudien die Anreicherung von T-Zellen in entzündetem Gewebe und die Vitalität von Herzwertgewebe in einem Herzinfarktmodell (*Manuskript in Vorbereitung*).

In der präklinischen Forschung werden biochemische Prozesse auch unter Verwendung von fluoreszierenden Biosensoren visualisiert. Genetisch encodierte Biosensoren sind Fusionsproteine aus einem oder zwei fluoreszierenden Proteinen und einer Sensordomäne. Diese führt über Änderung der Proteinstruktur zu einer Änderung der Fluoreszenz des Biosensors, sodass sich die Bindung eines Liganden oder eine andere biochemische Veränderung der Sensordomäne durch Fluoreszenzmikroskopie nachweisen lässt. Diese Methode erlaubt so die zerstörungsfreie Messung verschiedener biochemischer Parameter mit subzellulärer Auflösung in Echtzeit [4]. In geeigneten Modellen für die Intravitalmikroskopie lässt sich diese Methode auch

unter physiologischen Bedingungen verwenden. Der Schwerpunkt dieses Projekts lag dabei auf der Detektion von cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP) in Zellen, Geweben und lebenden Mäusen. Der intrazelluläre Botenstoff cGMP spielt in diversen Organsystemen eine wichtige Rolle, darunter in Nervensystem, Herz-Kreislaufsystem und Blut. So führt z.B. eine durch körpereigenes Stickstoffmonoxid ausgelöste Erhöhung des cGMP-Spiegels im glatten Muskel der Gefäßwand zu einer Gefäßerweiterung und damit zu einer Änderung von Blutfluss und Blutdruck. Im Labor von Prof. Feil stellten wir transgene Mauslinien her, die den cGMP-Biosensor cGi500 [5] exprimieren. Zunächst etablierten wir „cGMP-Imaging“ in Zellen und Geweben, die aus cGi500-exprimierenden Mäusen gewonnen wurden [6]. Darauf aufbauend konnten wir im Rahmen von Kooperationen mit Prof. Cor de Wit in Lübeck und Prof. Rakesh Jain und Prof. Dai Fukumura in Boston zeigen, dass sich mittels Intravitalmikroskopie in cGi500-exprimierenden Mäusen Erhöhungen des cGMP-Spiegels im Gefäßsystem *in vivo* nachweisen lassen und eine Korrelation von cGMP-Spiegel und Gefäßerweiterung möglich ist [7,8].

Intravitalmikroskopie unter Verwendung fluoreszierender Biosensoren und PET unter Verwendung einer Vielzahl verschiedener Tracermoleküle sind wichtige Methoden zur quantitativen Untersuchung biochemischer Prozesse im lebenden Organismus. Dabei ist insbesondere hervorzuheben, dass beide Methoden wiederholte Messungen im gleichen Versuchstier und damit longitudinale Studien ermöglichen, die es erlauben, qualitativ höherwertige Daten mit einer geringeren Zahl von Versuchstieren zu gewinnen.

Abschließend möchte ich mich ganz herzlich bei Robert Feil für seine Unterstützung während meiner Promotion und darüber hinaus bedanken. Außerdem danke ich Bernd Pichler für die Betreuung während meiner Diplomarbeit und der guten Zusammenarbeit an weiteren Projekten. Auch möchte ich mich bei allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Feil und der präklinischen Bildgebung für die gute Zusammenarbeit bedanken, ebenso wie bei allen Mitarbeitern des IFIB. Besonderer Dank gilt auch allen Kooperationspartnern, die zum Gelingen der verschiedenen Projekte beigetragen haben.

Literatur:

1. Gambhir, S.S. Molecular imaging of cancer with positron emission tomography. *Nat Rev Cancer* **2**, 683-93 (2002).
2. Fischer, K., Sossi, V., Schmid, A., **Thunemann, M.**, Maier, F.C., Judenhofer, M.S., Mannheim, J.G., Reischl, G. und Pichler, B.J. Noninvasive nuclear imaging enables the *in vivo* quantification of striatal dopamine receptor expression and raclopride affinity in mice. *J Nucl Med* **52**, 1133-41 (2011).
3. Gambhir, S.S., Bauer, E., Black, M.E., Liang, Q., Kokoris, M.S., Barrio, J.R., Iyer, M., Namavari, M., Phelps, M.E. und Herschman, H.R. A mutant herpes simplex virus type 1 thymidine kinase reporter gene shows improved sensitivity for imaging reporter gene expression with positron emission tomography. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 2785-90 (2000).
4. Miyawaki, A. and Niino, Y. Molecular spies for bioimaging-fluorescent protein-based probes. *Mol Cell* **58**, 632-43 (2015).
5. Russwurm, M., Mullershausen, F., Friebe, A., Jager, R., Russwurm, C. und Koesling, D. Design of fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based cGMP indicators: a systematic approach. *Biochem J* **407**, 69-77 (2007).
6. **Thunemann, M.**, Fomin, N., Krawutschke, C., Russwurm, M. und Feil, R. Visualization of cGMP with cGi biosensors. *Methods Mol Biol* **1020**, 89-120 (2013).
7. **Thunemann, M.***, Wen, L*., Hillenbrand, M., Vachaviolos, A., Feil, S., Ott, T., Han, X., Fukumura, D., Jain, R.K., Russwurm, M., de Wit, C. und Feil, R. Transgenic mice for cGMP imaging. *Circ Res* **113**, 365-71 (2013). (* *equal contribution*)
8. **Thunemann, M.**, Schmidt, K., de Wit, C., Han, X., Jain, R.K., Fukumura, D. und Feil, R. Correlative intravital imaging of cGMP signals and vasodilation in mice. *Front Physiol* **5**, 394 (2014).