

Molekulare Bildgebung zwischen Forschung und Klinik

Ein Paradigmenwechsel

Mit neuen Technologien dringt die medizinische Bildgebung auf die molekulare Ebene vor und induziert damit womöglich einen Paradigmenwechsel in Diagnostik und Therapie.

Der Begriff „Molekulare Bildgebung“ umschreibt die Diagnostik von Krankheiten auf der molekularen Ebene durch den Einsatz bildgebender Verfahren. So technisch diese Definition vordergründig klingen mag, so bedeutsam ist sie durchaus auch gesundheitspolitisch. Während noch vor wenigen Jahren in der kurativen Medizin Bildgebung als rein deskriptives, also morphologisch beschreibendes Verfahren eingesetzt wurde, entwickelt sich das Gesundheitssystem nun deutlich in Richtung „präventiv und prophylaktisch“. Bildgebung beschreibt heute eben nicht mehr nur morphologische Phänomene, sondern eröffnet vollkommen neue Einblicke in die molekularen Mechanismen der den Erkrankungen zugrunde liegenden pathophysiologischen und biochemischen Ereignisse und hat somit deutliche Auswirkungen auf bisherige Therapie- und Diagnostikverfahren.

Wo steht die molekulare Bildgebung heute in vorklinischer Forschung, in der

Klinik und im Routinelabor? Um diese Frage zu beantworten, sollten wir zuvor noch einmal das Grundprinzip betrachten. Eine Zielstruktur mit entsprechender Spezifität für die zu diagnostizierende Erkrankung (wie beispielsweise ein Oligonukleotid, Protein, Antikörperfragment oder Antikörper) wird durch Markierung zu einem diagnostischen Werkzeug, das dann optisch ausgelesen werden kann. Dafür stehen heute prinzipiell drei Verfahren zur Verfügung: Radionuklide, Markierungen für die Ultraschall-Technik und Fluoreszenzmarker.

Radiologie und Sonografie

Radioaktiv markierte Sonden lassen sich in der präklinischen Forschung und klinischen Diagnostik u.a. mittels Positronen-Emissions-Tomographie (PET) und *single photon emission computed tomography* (SPECT) nachweisen. Dabei steht der hohen Empfindlichkeit im picomolaren Bereich die (wenn auch nur geringe bis mäßige) Strahlenexposition der Patienten gegenüber. Kombiniert mit Verfahren wie der Magnetresonanztomographie – gemäß dem Motto „best of both worlds“ – sind diese Verfahren heute als multimodale Verfahren nicht nur in der

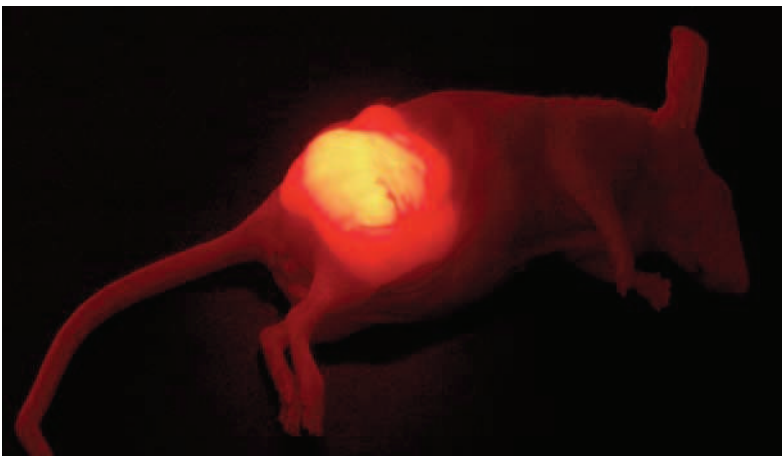
präklinischen Forschung, sondern auch am Patienten im Einsatz.

Vorteil dieser Verfahren ist zweifelsohne die Möglichkeit, den zu untersuchenden Körper vollständig zu penetrieren, was mit Licht/Fluoreszenz nicht möglich ist. Die Detektion von Fluoreszenz im Körperinneren scheitert an den physikalischen Limitationen der Eindringtiefe von Licht.

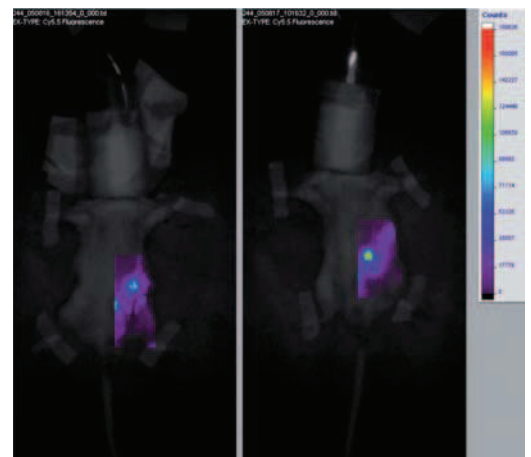
Einen Ausweg aus dem Dilemma zwischen Strahlenbelastung und Eindringtiefe könnten künftig Ultraschall-Verfahren bieten. Mittels Koppelung der Targets an z.B. luftgefüllte Nanopartikel lassen sich mit der Sonografie ähnlich gute Ergebnisse wie mit PET und SPECT bei hohen Eindringtiefen und ohne Strahlenexposition erzielen. In der Erforschung und Entwicklung neuer Ansätze leisten hier die Kollegen Prof. Ntziachristos (München) und Prof. Kiessling (Aachen) hervorragende Pionierarbeit.

Fluoreszenzmarker

Bereits heute haben auch fluoreszenzbasierte Verfahren in der dermatologischen Krebsdiagnostik, Gynäkologie (z.B. Mamma-Diagnostik), Urologie (z.B. Diagnostik Blasenkarzinom) und Neurochirurgie (z.B. Definition von Resektionsgrenzen



Nacktmaus mit einem implantierten humanen Nierenzellkarzinom. Die Zellen wurden im Labor mit einem fluoreszenzprotein-kodierenden Vektor transfiziert; eine zusätzliche Antibiotika-Kassette selektiert durch gezielte Behandlung mit dem dazu passenden Antibiotikum reine, fluoreszierende Zelllinien. Der Tumor befindet sich direkt unter der Haut auf der rechten Flanke. Seine Gefäßversorgung fluoresziert nicht, da sie von der Maus gebildet wurde. Mit diesem Modell lassen sich Tumoren, die noch nicht tastbar sind, frühzeitig erkennen. Es erlaubt auch, pharmakologische Substanzen mit Auswirkungen auf das Tumorstadium oder die Gefäßversorgung zu testen, z.B. Antiangiogenese-Medikamente, die die Bildung von Tumorgefäßen verlangsamen.



Laserbasierter Kleintierscanner. Die Maus wird in Narokose von einem Nahinfrarot-Laser durchleuchtet, das Bild aus Fluoreszenzsignalen vom Computer errechnet. Man sieht das Wachstum eines Tumors über die Zeit, links früh, rechts später – die Fläche ist größer und homogener. Die Farbskala korreliert mit der Zellzahl. Mit NIR-fluoreszierenden Antikörpern bzw. Medikamenten lassen sich z.B. molekulare Veränderungen am Tumor und/oder Therapieeffekte verfolgen.

beim Glioblastoma multiforme) Einzug gehalten. In der Rheumatologie werden laserbasierte Handgelenkscanner eingesetzt, um die autoimmunologisch bedingte Entzündung spezifisch zu detektieren, so die Diagnose schneller und einfacher zu stellen und vor allem früher eine Therapie zu ermöglichen, die irreversible Gelenkdestruktionen vermeidet.

In einer unlängst an der Göttinger Universitätsmedizin abgeschlossenen Studie zur Zulassung eines solchen Gerätes wurden viel versprechende Ergebnisse erzielt, über die in der nächsten Trillium-Ausgabe berichtet werden soll.

Multimodale Diagnostik

Der Trend geht dabei klar zur Kombination verschiedener technischer Verfahren in einem Gerät. Die Zukunft der klinischen Diagnostik via molekularer und optischer Bildgebung liegt sicher in ebendieser multimodalen Verbindung verschiedener Techniken wie der Kombination aus Ultraschall und Fluoreszenz oder von MRT und PET.

Am Übergang von der präklinischen Forschung zur klinischen Diagnostik werden für den Einsatz in der in-vivo Bildgebung am lebenden Organismus derzeit zahlreiche neue Produkte entwickelt. Ein besonders aktueller Trend ist der Wechsel von „klassischen“ Fluorophoren im grün-rot Bereich hin zur Nahinfrarot-Bildgebung (NIR). Um Zellen zum Leuchten zu bringen, schleust man seit einiger Zeit fluoreszenzprotein-kodierende genetische Vektoren und Fluoreszenzfarbstoffe ein. Zunehmend werden klassische Produkte wie das grüne Fluoreszenzprotein (z.B. eGFP) oder dessen rote Derivate (z.B. DsRED) durch Marker, die im NIR-Bereich leuchten, verdrängt.

Der Wechsel in den nahen Infrarotbereich (> 650 nm) erlaubt eine tiefere optische Penetration des zu untersuchenden Gewebes und minimiert zudem störende Autofluoreszenzen. Daraus resultiert letztlich ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis, das wiederum zu einer präziseren und sensitiveren in-vivo-Bildgebung führt.

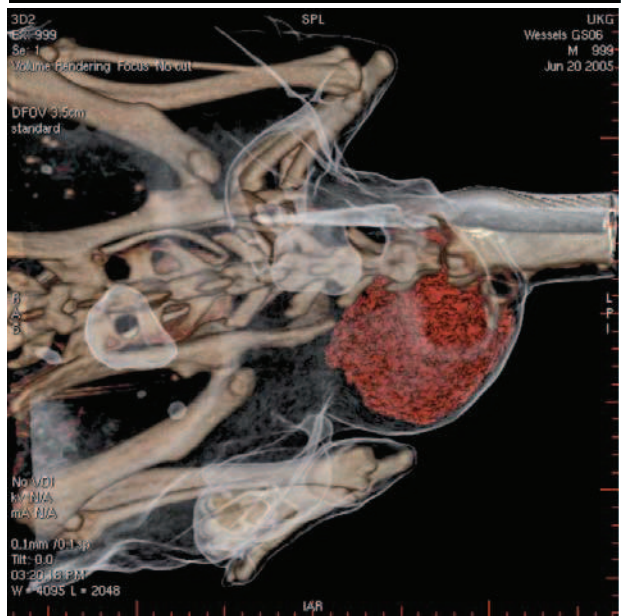
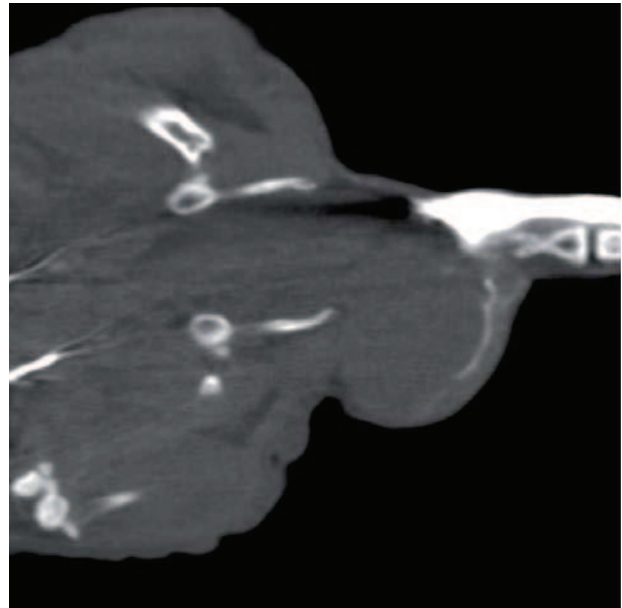
In der präklinischen Forschung an Kleintieren, beispielsweise in der Onkologie, ist der Einsatz von genetischen fluoreszenzprotein-kodierenden Vektoren im NIR-Bereich von großem Vorteil, da mit steigender Zellzahl das Fluoreszenzsignal des Tumors zunimmt. Hier kommen intravitale Mikroskope mit brillanten Optiken zum Einsatz, die es ermöglichen, im lebenden Tier einzelne markierte Tumorzellen in der Gefäßbahn in Echtzeit zu verfolgen und dabei sogar subzelluläre Strukturen zu erkennen.

Auch hier werden derzeit verschiedene Verfahren zu multimodalen Ansätzen kombiniert. So nützt die präklinische Forschung an der Göttinger Universitätsmedizin neben intravitalem Mikroskopieren vor allem laserbasierte Kleintierscanner und einen Flachdetektor-Volumencomputertomographen (fp-VCT) für das Auslesen der Signale (readout). Die zweidimensionalen Bilder des Laserscans können dann mit den dreidimensionalen Daten des fp-VCT verrechnet und überlagert werden, so dass Bilder von faszinierender Anschaulichkeit entstehen.

Auch in der mikroskopischen Diagnostik wird durch neue Verfahren die optische Eindringtiefe in Gewebe immer weiter optimiert. So lassen sich heute mit der Multiphotonen-Mikroskopie und gut ausgestatteten konfokalen Mikroskopen Tiefen von bis zu einem Millimeter erreichen. Die optische Auflösung solcher Systeme wird dabei durch neue Entwicklungen wie der Stimulated Emission Depletion (STED)-Mikroskopie durch Prof. Stefan Hell immer weiter verbessert.

Laserbasierte Systeme haben dabei ihre Stärke in der hervorragenden Bildqualität und in der Möglichkeit, 3D-Aufnahmen zu erzeugen. Ihre Schwäche bleibt die Echtzeitbildgebung, bedingt durch den Scan in xy-Richtung und die Verwendung von Photomultipliern gegenüber schnellen CCD-Kameras.

Die Weiterentwicklung der hier dargestellten Techniken und ihre Auswirkung auf die diagnostische Bildgebung und Labordiagnostik bleibt extrem spannend. Erkennbar ist schon jetzt, dass die molekulare Bildgebung zu einem verbesserten Verständnis vieler



Vergleich von konventioneller Röntgentechnik (oben) und Flachdetektor-Volumencomputertomografie (fp-VCT, unten) bei einem Tumor in der Maus. Deutlich erkennbar sind in kontrastmittel-optimierter Darstellung die unterschiedlichen Strukturen, deren differente Dichte über eine Falschfarbkodierung zum farbigen Bild führt.

Pathomechanismen bei bislang schwer zugänglichen chronischen Erkrankungen führt, und dass sie mit diesen Erkenntnissen dann auch rasch Eingang in die Klinik findet. So kann sie zu einer früheren Diagnostik und individuelleren Therapie führen und dazu beitragen, Spätschäden zu minimieren.



Dr. Johannes Wessels
Molecular & Optical Live Cell
Imaging, Universitätsmedizin
Göttingen, johannes.wessels@
med.uni-goettingen.de

Stammzelltransplantation

Die Erfolgsgeschichte der Transplantation blutbildender (*hämatopoetischer*) Zellen begann mit einem Ereignis, das die Welt erschütterte: Nach dem Abwurf der Atombomben von Hiroshima und Nagasaki wurde rasch klar, dass radioaktive Strahlung zur Zerstörung des Knochenmarks führen kann. Diesen Umstand macht man sich heute bei der Leukämiebehandlung therapeutisch zunutze, wohl wissend, dass dabei nicht nur die bösartigen Zellen, sondern auch die gesunden Stammzellen zugrunde gehen.

Ohne spezifische Therapie wäre diese Komplikation für den Patienten tödlich, da er nicht mehr in der Lage wäre, Blutzellen jedweder Art (rote, weiße und Blutplättchen) zu bilden. 1957 gelang die erste Übertragung von stammzellhaltigem Knochenmark von einem gesunden auf einen leukämiekranken Zwilling, 1968 die erste allogene Transplantation zwischen nicht Verwandten. Heute gibt es in Deutschland über 100 Stammzell-Transplantationszentren.



Das klassische Verfahren ist die Übertragung von stammzellhaltigem Blut aus dem Knochenmark. Dem Spender wird dabei mit einer kräftigen Nadel in Vollnarkose etwa ein Liter Knochenmark-Blut-Gemisch entnommen, das aufgereinigt und in einen Blutbeutel überführt wird. Dieses Transplantat wird dann aus dem Beutel über einen Katheter in den Empfänger transfundiert.

Weniger eingreifend als diese Knochenmarkspende ist die Blutstammzellspende. Dabei wird dem Spender etwa eine Woche lang eine hormonartige Substanz (G-CSF) gespritzt, die bewirkt, dass Stammzellen aus dem Knochenmark ins Blut übergehen. Dort können sie dann mittels Apherese (Blutzellseparation) herausgefiltert und in einen Blutbeutel überführt werden.

Die transplantierten Stammzellen finden ihren Weg von selbst in die Knochen des Patienten und fangen nach etwa zehn Tagen mit der Produktion neuer Zellen an. Dabei teilen sie sich nach derzeitiger Auffassung "asymmetrisch", das heißt eine der beiden Tochterzellen behält ihre blutbildenden Stammzeleigenschaften bei, die andere reift zu einem der drei oben genannten Zelltypen und wandert in den Blutkreislauf aus.

Züchtung hämatopoetischer Stammzellen

Erste Erfolge

Blutbildende Stammzellen spielen eine bedeutende Rolle bei der Leukämiebehandlung. Außerhalb des Körpers lassen sie sich bislang nicht in ausreichender Menge vermehren, aber die Erforschung der optimalen Milieubedingungen macht Fortschritte.

Die hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) sind die wohl bestuntersuchten adulten Stammzellen überhaupt. Sie werden seit über 30 Jahren für die Behandlung von Leukämiepatienten nach aggressiver Strahlen- oder Hochdosis-Chemotherapie eingesetzt, um die zerstörte Blutbildung wieder herzustellen. In Zellpräparaten enthaltene HSZ haben die Fähigkeit, über den Blutkreislauf in das Knochenmark des Patienten einzuwandern, sich dort einzunisten und ihre normale hämatopoetische Funktion aufzunehmen; so leisten sie einen entscheidenden Beitrag zur Heilung des Patienten.

Da sich die gesunden körpereigenen HSZ des Patienten nicht vollständig von den leukämischen Zellen trennen lassen, muss man in der Regel auf Spendermaterialien zurückgreifen. Neben herkömmlichen Knochenmarkspenden setzen sich zunehmend Stammzellpräparationen durch, die nach Zytokin-Stimulation aus peripherem Blut der Spender durch Apherese isoliert werden oder aus Resten von Nabelschnurblut stammen. Zunehmend propagieren kommerzielle Unternehmen zu diesem Zweck auch die vorsorgliche Einlagerung körpereigener (autologer) Nabelschnur Stammzellen von Neugeborenen, doch dies ist kritisch zu sehen: Im Nabelschnurblut von später an Leukämie erkrankten Kindern wurden bereits zum Zeitpunkt der Entnahme maligne Zellen nachgewiesen.

Die große Hoffnung der Forscher ist es natürlich, diese Zellen außerhalb des Körpers (*ex vivo*) zu züchten. Entscheidend dabei ist, dass sie ihre Stammzelei-

genschaften behalten und nicht ausreifen. Auch wenn inzwischen verschiedene Bedingungen beschrieben wurden, die die Reifung in der Zellkultur deutlich verlangsamen, lassen sich HSZ außerhalb des Körpers leider immer noch nicht in nennenswertem Maßstab expandieren.

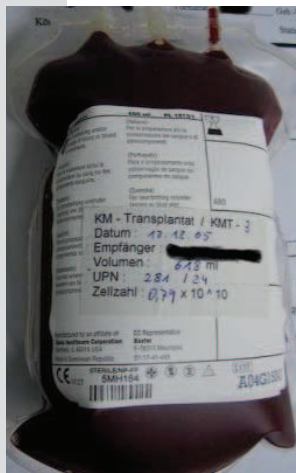
Aufgrund von Beobachtungen an transplantierten Patienten und Versuchstieren kann man zwar davon ausgehen, dass sich menschliche HSZ grundsätzlich vervielfältigen können, aber bislang ist es den Forschern noch nicht gelungen, die *in vivo* herrschenden Expansionsbedingungen in der Zellkultur nachzustellen. Weltweit arbeitet man deshalb an der Aufklärung der Mechanismen, die die Stammzeleigenschaften *in vivo* erhalten und die Zellvermehrung steuern.

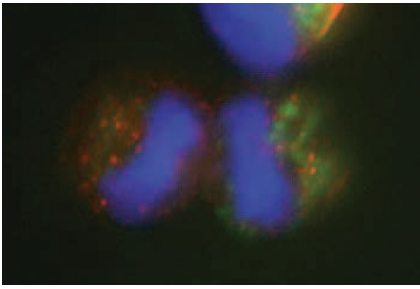
HSZ befinden sich normalerweise sowohl beim Menschen als auch bei der Maus in bestimmten Regionen im Knochenmark, den so genannten Stammzellnischen. Verschiedene Gruppen versuchen, das biochemische Milieu dieser Nischen zu charakterisieren, um es in Kultur besser nachbilden zu können.

Dr. Robert Oostendorp von der Technischen Universität München berichtete bei dem IGLD Meeting 2009, dass seine Arbeitsgruppe in der Mikroumgebung der Knochenmarkszellen von Mäusen stromale Zellen fand, die lösliches Sfrp1 (sezerniertes Frizzled-ähnliches Protein 1) produzieren. Es übt einen deutlichen Einfluss auf das Zellteilungs- und Differenzierungsverhalten von Stammzellen aus und scheint eine notwendige Voraussetzung dafür zu sein, die Zahl der murinen hämatopoetischen Stammzellen *in vivo* und *in vitro* zu erhalten.

Eigene Experimente

Oft wurde postuliert, dass sich Stammzellen asymmetrisch teilen und eine der entstehenden Tochterzellen die Stammzellefähigkeit der Pluripotenz beibehält, während die andere Tochterzelle zur Reifung bestimmt ist. Solche asymmetrischen Zellteilungen sind in Modellorganismen wie der Fruchtfliege und dem Fadenwurm sehr gut untersucht. Dort konnten auch Proteine identifiziert werden, die während der Zellteilung ungleich auf die entstehenden Tochterzellen verteilt werden und für das unterschiedliche Schicksal der beiden Tochterzellen verantwortlich sind.





Asymmetrische Teilung einer Stammzelle: Während das rot angefärbte Protein gleichmäßig auf beide Tochterzellen verteilt wird, erhält nur eine von beiden das grün angefärbte Protein. Der blaue Farbstoff markiert die DNA der sich teilenden Zelle.

Bei menschlichen hämatopoetischen Stammzellen suggerierten Beobachtungen

zwar ebenfalls die Fähigkeit zur asymmetrischen Teilung, jedoch waren bislang keine Proteine bekannt, die wie im Tiermodell ungleich verteilt werden. Unsere Gruppe überprüft derzeit das Modell der asymmetrischen Zellteilung. Durch eine Kombination durchflusszytometrischer und mikroskopischer Techniken ließen sich vier Proteine identifizieren, die in einigen hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen ungleich auf die bei der Teilung entstehenden Tochterzellen verteilt werden. In der Abbildung ist dies durch die unterschiedliche Fluoreszenz der markierten Antikörper erkennbar. Durch dieses Experiment konnten wir erstmals die aus Tierversuchen postulierte asymmetrische Verteilung von Proteinen in menschlichen Stamm- und Vorläuferzellen belegen.

In weiterführenden Studien untersuchen wir nun die Funktion, die diese asymmetrisch verteilten Proteine auf die beiden Tochterzellen ausüben. Wir hoffen, dadurch mehr über die Biologie dieser Zellen und ihre Züchtung außerhalb des Organismus zu lernen.

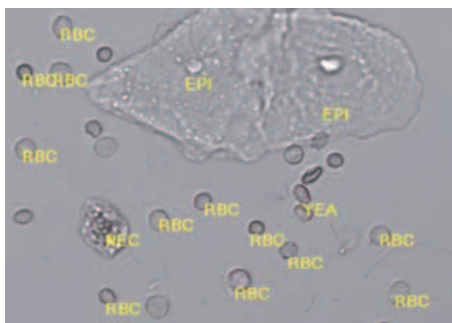
Es ist sicherlich noch ein längerer Weg, bis eine Stammzelllexpansion im klinischen Maßstab und unter klinisch kompatiblen Bedingungen durchgeführt werden kann. Wir sind aber optimistisch, dass es uns Wissenschaftlern in der kommenden Dekade gelingen wird.

Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Bernd Giebel
Institut für Transfusionsmedizin
Universitätsklinikum Essen
bernd.giebel@uk-essen.de

Effizienzgewinn durch vollständige Automatisierung des mikroskopischen Sediments

Intelligenter Workflow im Harnlabor

SediMAX heißt der jüngste Urin-Analyser von A. Menarini Diagnostics. Er bietet eine schnelle, anwenderfreundliche und zuverlässige Hightech Anwendung für den herkömmlichen mikroskopischen Urinsediment-Untersuchungsprozess. Diese Methode erweist sich als essentiell für eine Vielzahl von Erkrankungen.



Eine intelligente Software identifiziert die verschiedenen Zelltypen aufgrund morphologischer Kriterien.

Dank seines integralen Mikroskops und seiner Bildverarbeitungs-Software kann SediMAX eine Vielzahl von Partikeln identifizieren. Daraus erstellt SediMAX eine Zählstatistik jedes Partikels der Probe und liefert eine Gesamt-Interpretation der Ergebnisse. Während SediMAX die gesamte Arbeit sorgfältig, präzise und richtig (bis

zu 80 Proben / Stunde) erledigt, kann sich der Anwender auf andere Labortätigkeiten konzentrieren. Das Besondere an dem Sedimentanalyser ist sein Gedächtnis. Nach der Testdurchführung unterstützen eine anwenderfreundliche PC-Bedienung und die komplett zugängliche Datenbank mit den gesamten Bildern am Bildschirm eine Nachbewertung der Proben für die problematischsten, vom System markierten Fälle. Die für die Erstellung der Diagnose erforderliche Erfahrung des menschlichen Anwenders und dessen Bewertung werden auf diese Weise für die Nach-Evaluierung von Proben auf dem Bildschirm systematisch mit einbezogen und genutzt.

Die auf dem Monitor angezeigten Bilder entsprechen denen der herkömmlichen mikroskopischen Untersuchung. D.h., es handelt sich um eine Gesamtgesichtsfeld-Darstellung, mit der Möglichkeit, Einzelpartikel noch zusätzlich heraus zu vergrößern. Dieses einzigartige Merkmal erlaubt auch mehr als einem Anwender gleichzeitig die Betrachtung des Bildschirms und die Diskussion der Bilder. Daraus ergibt sich der Zusatznutzen – den SediMAX für Schulungszwecke einzusetzen.

Der SediMAX bietet in Kombination mit dem Harnstreifen-Vollautomaten ein System für den kompletten Harnbefund. Verbunden werden die zwei Systeme mittels einer mechanischen Verbindungsbrücke. Mit der Kombination erhält der An-

wender einen Gesamtbefund durch eine chemische und eine Sediment-Analyse, der ihm ein Höchstmaß an Sicherheit bei der Interpretation bietet.

Nach der chemischen Analyse durch den Harnstreifen-Vollautomaten kann mittels eines integrierten PC-Interfaces eine Zuweisung ausschließlich der positiven Proben zum SediMAX für die Sediment-Analyse erfolgen. Am Ende des Prozesses erscheint der gesamte Befund sowohl aus chemischer als auch Sediment-Analyse simultan auf dem Bildschirm. In der Kopplung bilden Harnteststreifenautomat und SediMAX damit ein optimales Gespann zur Erreichung von Qualität, Ergebnissicherheit und schnellerer Befunderstellung.

Durch den vollautomatischen Kombinationsbetrieb sowohl der Teststreifenanalytik als auch des Harnsediments wird die erwünschte Optimierung der Labororganisation (Workflow-Optimierung) im Harnlabor erreicht. Einfach, zuverlässig sowie zeit- und kostensparend erfüllt SediMAX die Anforderungen von Labors aller Größen. Damit wird er sich in kürzester Zeit als unersetzlicher Bestandteil effizienter Labore erweisen.

Dr. Christian Heller, Produktmanager
A. Menarini Diagnostics Deutschland
Division der BERLIN-CHEMIE AG
Glienicke Weg 125, 12489 Berlin
cheller@menariniagnostics.de