

Ein spektrales Fenster in die Zelle

Peter Hildebrandt*

Bildgebende Spektroskopie · Carbonylliganden ·
Raman-Mikroskopie · Tumorthерапеutika · Zellen

Die Pharmakaentwicklung – von der chemischen Synthese über vorklinische und klinische Untersuchungen bis hin zur Zulassung – ist ein zeitaufwändiger und kostenintensiver Prozess. Die Berücksichtigung rationaler Prinzipien bei der Wirkstoffentwicklung könnte dabei erheblich zur Kostenenkung beitragen und insbesondere die Dauer von vorklinischen Untersuchungen verringern. Solche Strategien erfordern jedoch detaillierte Kenntnisse über die molekularen Prozesse des Wirkstofftransfers in die Zelle und der Wechselwirkungen mit den Zielmolekülen. Auch wenn strukturbiologische Methoden und Modellierungstechniken wichtige Erkenntnisse über molekulare Wechselwirkungen von Wirkstoffen und Biomolekülen liefern können, bedarf es doch darüber hinaus geeigneter Techniken, mit denen sich die Prozesse von Wirkstoffen in Zellen gleichzeitig auf molekularer und mikroskopischer Ebene verfolgen lassen.

Bereits vor 20 Jahren wurde vorgeschlagen, diese Lücke durch die Raman-Spektroskopie zu schließen, die Informationen über die molekulare Struktur liefert und nicht auf bestimmte Probenanordnungen beschränkt ist, eine wichtige Voraussetzung für In-situ-Untersuchungen. Daher rückten mit der Entwicklung der konfokalen Raman-Spektroskopie und der Möglichkeit, Moleküle mit mikroskopischer Auflösung zu detektieren (Raman-Mikroskopie), zelluläre Systeme und speziell medizinische Anwendungen in den Mittelpunkt der Forschung. Dabei haben die grundlegenden Arbeiten von Puppels et al.^[1] eine große Zahl von Untersuchungen an einzelnen Zellen und Gewebe motiviert, die oft auf diagnostische Anwendungen der Raman-Mikroskopie abzielten. Allerdings folgte dem ursprünglichen Enthusiasmus bald eine gewisse Ernüchterung angesichts der intrinsischen Beschränkungen der Raman-Spektroskopie, die in der relativ niedrigen Empfindlichkeit und Selektivität begründet sind. Versuche, diese Nachteile durch Nutzung der (Prä-)Resonanz-Raman-Verstärkung bei Biomolekülen zu kompensieren, stellten sich als problematisch heraus, da die erforderlichen höheren Anregungsenergien mitunter zu photoinduzierten Zersetzungsprozessen führten.^[2] Als Konsequenz ist die Anwendung der Raman-Mikroskopie in der Medizin auf

einige wenige Nischen beschränkt, trotz weiterer methodischer Fortschritte. Kohärente Anti-Stokes-Raman-Spektroskopie (CARS) und stimulierte Raman-Spektroskopie wurden z.B. als bildgebende spektroskopische Techniken weiter entwickelt.^[3,4] Beide Methoden zeichnen sich durch eine deutlich erhöhte Empfindlichkeit aus und sind sehr vielversprechend für In-situ-Untersuchungen an zellulären Systemen – und damit auch für medizinischen Anwendungen. Allerdings sind beide Methoden technisch sehr anspruchsvoll, was ihre Nutzungsmöglichkeiten im Routinebetrieb erheblich einschränkt. Zudem ist die Selektivität wie bei der konventionellen Raman-Spektroskopie gering.

Eine erhöhte Selektivität kann jedoch dann erreicht werden, wenn es gelingt, geeignete spektrale Fenster zu nutzen, in denen charakteristische Banden auftreten, die ausschließlich von der Zielverbindung stammen. Ein möglicher Ansatz besteht darin, durch spezifische Isotopenmarkierung der Zielverbindung Schwingungsbanden in einen relativ „freien“ Bereich des Spektrums zu verschieben. So kann, wie Raman-mikroskopische Untersuchungen mit deuterierten Lipidkomponenten gezeigt haben, der Kontrast zwischen den Signalen der Zielverbindung und dem Untergrund verstärkt werden.^[5] Solche Studien können wertvolle Informationen über spezifische Prozesse in zellulären Systemen liefern; allerdings steht die Notwendigkeit der Isotopenmarkierung einer generellen Anwendbarkeit entgegen. Dennoch unterstreicht dieser Ansatz die Vorteile von spektralen Fenstern. Markerbanden natürlicher Reportergruppen, die in spektralen Fenstern auftreten, sind die der Stretschwingsungen von CN- und CO-Liganden von Metallzentren, wie sie in verschiedenen Enzymen, unter anderem in Hydrogenasen, zu finden sind.^[6] Die Banden werden im Bereich von 1900 bis 2100 cm⁻¹ beobachtet, sind IR-spektroskopisch selektiv und ohne störende Überlagerung durch die stärkeren Banden der Proteinmatrix detektierbar. Diese Methode wurde zur Untersuchung dieser Enzyme in komplexen biologischen Umgebungen wie intakten Membranen eingesetzt.^[7]

In einem kürzlich vorgestellten Raman-mikroskopischen Ansatz wurde die CO-Stretschwingsmode für eine Blick in das Zellinnere genutzt,^[8] um die Aufnahme und die Verteilung einer pharmakologisch aktiven Verbindung, eines CO freisetzenden Komplexes (CORM), zu verfolgen.^[9] CORMs sind Metallcarbonylkomplexe, die als CO-Reservoir fungieren und die CO-Liganden photoinduziert durch Bestrahlung im Nah-UV-Bereich freisetzen. Der besondere Vorteil der CORMs besteht darin, dass die toxische Wirkung von CO gegen Biomoleküle mit hoher Selektivität initiiert werden

[*] Prof. P. Hildebrandt

Technische Universität Berlin,
Institut für Chemie, Sekr. PC14
Straße des 17. Juni 135, 10623 Berlin (Deutschland)
Fax: (+49) 30-3142-1122
E-Mail: hildebrandt@chem.tu-berlin.de
Homepage: <http://www.biophys-chemie.tu-berlin.de/>

kann, was wiederum außerordentlich bedeutsam für die Krebstherapie ist. Zur Ausschöpfung des Potenzials dieser Verbindungen müssen jedoch die Bedingungen für die Aufnahme der CORMs durch die Zelle und den intrazellulären Transport zum eigentlichen Zielort optimiert werden, eine Aufgabe, zu der der von Meister et al.^[8] entwickelte Raman-mikroskopische Ansatz beitragen kann.

Ziel der Studie war es, Aufnahme und Verteilung von $[\text{Mn}(\text{CO})_3(\text{tpm})]\text{Cl}$ ($\text{tpm} = \text{Tris}(\text{pyrazol}-2\text{-yl})\text{methan}$) in menschlichen HT29-Darmkrebszellen zu verfolgen. Die Verbindung weist eine Raman-aktive CO-Streckschwingung bei 1963 cm^{-1} auf. Trotz ihrer niedrigen relativen Intensität kann diese Bande nach Aufnahme von $[\text{Mn}(\text{CO})_3(\text{tpm})]\text{Cl}$ in einzelnen Zellen detektiert werden, da die weitaus stärkeren Raman-Banden der übrigen Zellkomponenten mehr als 250 cm^{-1} entfernt auftreten (Abbildung 1). Die Spektren wurden mit einem konfokalen Raman-Spektrometer aufgenommen, wobei die verwendete Anregungsenergie von 532 nm niedrig genug war, um eine Photodissociation der CO-Liganden zu vermeiden. Im bildgebenden Modus wurden unter Verwendung eines motorisierten Präzisionstisches einzelne Zellen mit dem Laserfokus abgetastet, indem von jedem Rasterpunkt ein komplettes Spektrum aufgenommen

wurde. Dadurch konnten gleichzeitig Bilder anhand unterschiedlicher Raman-Banden erhalten werden (Abbildung 1). Die Autoren nutzten dabei die CO-Streckschwingung des $[\text{Mn}(\text{CO})_3(\text{tpm})]\text{Cl}$ und die Umhüllende der CH-Streckschwingungen aller Zellbestandteile. Die Intensitätsverteilung der CH-Streckschwingungen ergibt daher ein Bild der Konturen der Zelle und ihrer Organellen, was sehr gut mit einem konventionell-mikroskopischen Bild übereinstimmt. Die Intensität der CO-Streckschwingung spiegelt die Verteilung des Carbonylkomplexes in der Zelle wider. Die Kombination beider Bilder zeigt besonders hohe Konzentrationen des Komplexes am Zellkern. Dieser Befund lässt darauf schließen, dass die photoinduzierte cytotoxische Aktivität von $[\text{Mn}(\text{CO})_3(\text{tpm})]\text{Cl}$ ^[10] aus dem Angriff von CO speziell auf den Zellkern resultiert. Zusätzlich zur lateralen Auflösung konnte auch ein Profil der $[\text{Mn}(\text{CO})_3(\text{tpm})]\text{Cl}$ -Verteilung in z -Richtung erhalten werden, was besonders für mögliche Gewebeuntersuchungen von Interesse ist.

Der hier vorgestellte Ansatz eröffnet interessante Perspektiven für künftige Untersuchungen. So könnte man versuchen, noch umfassender die Vorteile der Schwingungsspektroskopie zu nutzen und aus der Analyse möglicher spektraler Änderungen der CO-Streckschwingungsmoden auf spezifische Wechselwirkungen des Komplexes mit Zielmolekülen zu schließen. Von besonderer Bedeutung ist der Versuch, zwischen dem ungebundenen und dem an Biopolymere gebundenen $[\text{Mn}(\text{CO})_3(\text{tpm})]\text{Cl}$ zu unterscheiden. Vergleichende In-vitro-Untersuchungen mit gereinigten Proteinen und DNA könnten so dazu beitragen, die zellulären Zielmoleküle zu identifizieren. Zudem scheint der Raman-mikroskopische Ansatz auch geeignet, die photoinduzierte CO-Freisetzung mit mikroskopischer Auslösung zu verfolgen und Reaktionsprodukte zu bestimmen. Diese Ziele erfordern vermutlich weitere Maßnahmen zur Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses. Angesichts der zu erwartenden Ergebnisse, die wertvolle Hinweise zur Entwicklung verbesserter CORMs liefern können, sind die Anstrengungen jedoch gerechtfertigt. Im weiteren Sinne ist auch – unabhängig von etwaiger pharmakologischer Aktivität – die ausschließliche Fokussierung auf die Reporterfunktion der metallgebundenen CO-Gruppe interessant, wenn es gelingt, andere Verbindungen und keineswegs nur Wirkstoffe mit einer Metallcarbonyl-Einheit zu verknüpfen und in Zellen einzuführen. Die Prozesse derart markierter Verbindungen in Zellen können dann Raman-mikroskopisch mit einer räumlichen Auflösung untersucht werden, die deutlich höher ist als jene der IR-Mikroskopie.^[11] Solche Untersuchungen können ganz generell zur Aufklärung zellulärer Prozesse in der Grundlagen- oder anwendungsorientierten Forschung beitragen.

Eingegangen am 18. März 2010
Online veröffentlicht am 27. Mai 2010

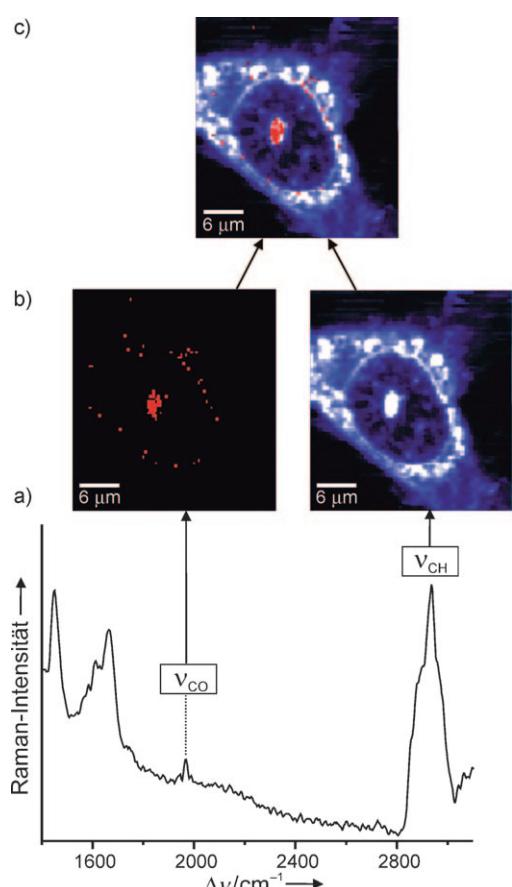


Abbildung 1. a) Raman-Spektrum einer HT29-Zelle nach Inkubation mit $[\text{Mn}(\text{CO})_3(\text{tpm})]\text{Cl}$; b) Intensitätsverteilung der CH-Streckschwingungen (rechts; weiß) und CO-Streckschwingung (links; rot); c) eine Überlagerung der Bilder in (b); Wiedergabe mit freundlicher Genehmigung von K. Meister.

- [1] G. J. Puppels, F. F. M. De Mul, C. Otto, J. Greve, M. Robert-Nicoud, D. J. Arndt-Jovin, T. M. Jovin, *Nature* **1990**, *347*, 301–303.
- [2] G. J. Puppels, W. Colier, J. H. F. Olminkhof, C. Otto, F. F. M. De Mul, J. Greve, *J. Raman Spectrosc.* **1991**, *22*, 217–225.
- [3] C. L. Evans, X. S. Xie, *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2008**, *1*, 883–909.

- [4] C. W. Freudiger, W. Min, B. G. Saar, S. Lu, G. R. Holtom, C. He, J. C. Tsai, J. X. Kang, X. S. Xie, *Science* **2008**, 322, 1857–1861.
- [5] C. Matthäus, A. Kale, T. Chernenko, V. Torchilin, M. Diem, *Mol. Pharm.* **2008**, 5, 287–293.
- [6] A. L. De Lacey, V. M. Fernandez, M. Rousset, R. Cammack, *Chem. Rev.* **2007**, 107, 4304–4330.
- [7] M. Saggù, I. Zebger, M. Ludwig, O. Lenz, B. Friedrich, P. Hildebrandt, F. Lendzian, *J. Biol. Chem.* **2009**, 284, 16264–16276.
- [8] K. Meister, J. Niesel, U. Schatzschneider, N. Metzler-Nolte, D. A. Schmidt, M. Harenith, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 122, 3382–3384; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 3310–3312.
- [9] T. R. Johnson, B. E. Mann, J. E. Clark, R. Foresti, C. J. Green, R. Motterlini, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 1773–1776; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 1731–1734.
- [10] J. Niesel, A. Pinto, H. W. Peindy N'Dongo, K. Merz, I. Ott, R. Gust, U. Schatzschneider, *Chem. Commun.* **2008**, 1798–1800.
- [11] K. V. Kong, W. Chew, L. H. K. Lim, W. Y. Fan, W. K. Leong, *Bioconjug. Chem.* **2008**, 18, 1370–1374.

Neugierig? Sachbücher von WILEY-VCH

MICHAEL GROß

Der Kuss des Schnabeltiers

und 60 weitere irrwitzige Geschichten aus Natur und Wissenschaft

ISBN: 978-3527-32490-3
September 2009 278 S. mit 26 Abb.
Gebunden € 24,90

Groß berichtet von winzigen „Bärtierchen“, die schon mal einen „Winterschlaf“ von 100 Jahren machen; von Fröschen, die man getrost küssen kann, auch wenn sie sich nicht in Prinzen verwandeln; von der Rekonstruktion genetischer Codes, die uns irgendwann einen echten Jurassic Park bescheren könnten. „Die Maus, die in die Kälte ging“, „Bakterien halten zusammen“ oder „Die spinnen, die Spinnen!“ – Michael Groß hat Spaß an den intelligenten und mitunter etwas bizarren Erfindungen der Natur. Spannende Phänomene, dazu ungewöhnliche Forscherpersönlichkeiten und neueste Technologien stellt er in 61 Kapiteln vor.

Der Chemiker und Wissenschaftsjournalist, der auch für Magazine wie „Nature“ oder „New Scientist“ schreibt, zeigt, dass Wissenschaft Spaß macht, Neugier weckt und den eigenen Forschergeist beflügelt.



52034008_hu

WILEY-VCH

Wiley-VCH • Tel. +49 (0) 62 01-606-400 • Fax +49 (0) 62 01-606-184 • E-Mail: service@wiley-vch.de

www.wiley-vch.de/sachbuch