

Projektplan

Mitoskopie: Mitochondriales Monitoring von Stoffwechseländerungen bei neurologischen Erkrankungen mittels optischer Systeme

Mitochondriale Veränderungen spielen bei der Ausbildung einer Vielzahl von Krankheiten des höheren Lebensalters, insbesondere bei neurologischen Erkrankungen, wie Alzheimer Demenz (AD) und Morbus Parkinson eine zentrale Rolle. Die Aufklärung komplexer mitochondrialer Stoffwechselfvorgänge stellt hohe Anforderungen an die Untersuchungsmethode, sowohl was Datenaufnahme in lebenden Zellen als auch die Erfassung verschiedener Stoffwechselfparameter nebeneinander betrifft.

Mit den bisher zur Verfügung stehenden Verfahren kann dies nur unzureichend erfasst werden. Die innovative Kombination zweier mikroskopischer Verfahren zum *in vivo* Monitoring des mitochondrialen Stoffwechsels mit hoher zeitlicher und räumlicher Auflösung eröffnet die Möglichkeit, mit einem Basisgerät deutlich mehr Informationen zu erzeugen. Ziel des Projektes ist es bei neurodegenerativen Erkrankungen mehrere zentrale Parameter des mitochondrialen Stoffwechsels parallel zu analysieren und Veränderungen "on-line" zu messen. Dies beinhaltet zum einen Autofluoreszenzmessungen wichtiger mitochondrialer Enzyme, wie NADH und FAD⁺ mittels zeitaufgelöster Fluoreszenz Lebenszeit Mikroskopie (FLIM) und zum anderen Messungen des Sauerstoff Partialdruckes. Der Sauerstoff Partialdruck soll dabei durch Messung der Phosphoreszenz Lebenszeit (PLIM) eines Phosphoreszenzmarkers bestimmt werden. Diese Methode besitzt ein enormes Potential als Screening System für Medikamente.

Forschungsziel

Ziel der Forschungsarbeiten, welche von den beiden Forschungsstellen Core Facility „konfokale und Multiphotonen Mikroskopie“ der Universität Ulm und der Abteilung Neurologie der Universitätsklinik Ulm gemeinsam durchgeführt werden, ist das *in vitro* und *in vivo* Monitoring von mitochondrialen Stoffwechselveränderungen in Zell- und Tiermodellen bei neurodegenerativen Erkrankungen. Dabei ermöglicht die intrazelluläre Detektion der Fluoreszenzabklingzeit von NADH im Rahmen von FLIM eine Beurteilung des Energiegewinnungsprozesses der Zelle und indirekt auch die der Sauerstoffversorgung der Zelle.

Zwei der wichtigsten Parameter zur Messung von verändertem mitochondrialem Energiestoffwechsel sind das Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) und das Flavin adenine dinucleotide (FAD). NAD und FAD spielen im Zellmetabolismus und dem Prozess der mitochondrialen Energiegewinnung eine bedeutende Rolle. Grob vereinfacht spielen hier zwei Reaktionen eine Schlüsselrolle, zum einen die im Inneren der Mitochondrien stattfindende oxidative Phosphorylierung, zum anderen die im Zytoplasma erfolgende Glykolyse. NADH ist dabei das wichtigste intrazelluläre Koenzym. Im Falle der oxidativen Phosphorylierung wird NADH zu NAD⁺ oxidiert bzw. FADH zu FAD⁺, bei der Glykolyse entsteht NADH. NADH kann gebunden an Proteine oder frei in der Zelle vorkommen. Beide Zustände lassen sich über die Fluoreszenzabklingzeit des Moleküls unterscheiden, gebundenes NADH besitzt eine signifikant längere Fluoreszenzabklingzeit als freies NADH. Bei einem Wechsel von oxidativer Phosphorylierung zu Glykolyse nimmt der Anteil

an freiem NADH zu, was mit einer Änderung der Fluoreszenzabklingzeit korreliert ist. Zur genauen Quantifizierung der Sauerstoffversorgung der Zellen eignet sich die NADH-FLIM Methode jedoch nicht.

Der Sauerstoffpartialdruck (pO_2) kann jedoch durch zeitgleiche Messung der Phosphoreszenzabklingzeit eines Phosphoreszenzfarbstoffs gemessen werden. pO_2 kann optisch durch die sogenannte Phosphoreszenz Quenching Methode gemessen werden. Abhängig vom pO_2 ändert sich die Phosphoreszenzabklingzeit von zur Phosphoreszenz befähigten Molekülen signifikant. Die bildgebende Darstellung der Phosphoreszenzabklingzeit wird entsprechend als PLIM ("phosphorescence lifetime imaging") bezeichnet.

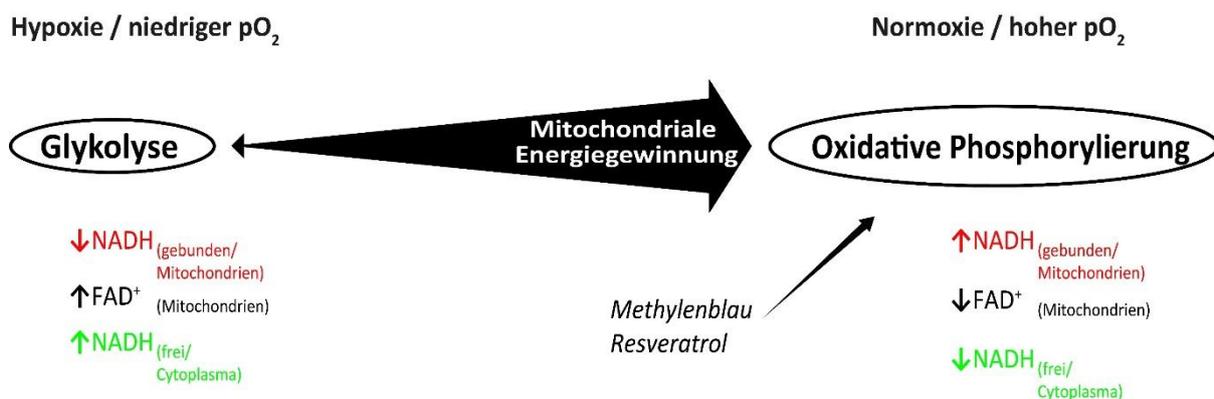


Abb.1: Glykolyse, oxidative Phosphorylierung und Sauerstoffpartialdruck

Lösungsweg zur Erreichung des Forschungsziels

Das übergeordnete Ziel ist die Evaluation eines *in vivo* FLIM/PLIM Systems, das das Monitoring verschiedener Aspekte des mitochondrialen Stoffwechsels sowohl im Zellmodell, in murinen *ex vivo* Hirn-Schnitten als auch in transgenen Tieren (cranial window) ermöglicht. Das angestrebte Produkt leistet einen innovativen Beitrag zur Erforschung der Alzheimer Erkrankung und eignet sich zur Entwicklung neuer Therapeutika. Das Ziel soll durch folgende Maßnahmen erreicht werden:

- 1)** Multimodale FLIM/PLIM Messungen zur simultanen Aufklärung mitochondrialer Stoffwechseleränderungen in neuronalen Zelllinien, primären neuronalen Zellen und im Gewebeverbund.
- 2)** Validierung der Methode am Alzheimer Modell in Zellkultur sowie Adaption des Systems zum *in vivo* Monitoring von Alzheimer-Modellen in Hirn-Schnitten.
- 3)** Analyse der Effekte verschiedener potentiell therapierelevanter Substanzen auf den mitochondrialen Stoffwechsel im Alzheimer-Modell.

Nutzen und wirtschaftliche Bedeutung des Forschungsthemas

Die im Rahmen dieses Projektes umgesetzten innovativen Verbesserungen etablierter Mikroskopieverfahren ermöglichen die simultane Darstellung mitochondrialer Stoffwechseleränderungen. Damit steigert das entwickelte Verfahren das Basiswissen um die Alzheimer-Krankheit sowie anderer neurodegenerativer und volkswirtschaftlich relevanter Erkrankungen, da es zur Erforschung und Entwicklung möglicher Medikamente eingesetzt werden kann.

Durch die betriebene Weiterentwicklung neuartiger bildgebender Technologien zur Bekämpfung von Krankheiten, deren volkswirtschaftliche Auswirkungen dramatisch sind, wird insbesondere der Standort Deutschland als Vorreiter und Exporteur optischer, innovativer Forschungstechnologien ganz allgemein gestärkt.

Voraussichtlicher Beitrag zur Steigerung der Wettbewerbsfähigkeit der KMU

Dieses Projekt liefert einen branchenübergreifenden Beitrag zur wirtschaftlichen Steigerung von KMUs in den Bereichen Optische Technologien, Mikroskopie, medizinische Diagnostik, pharmakologisches Screening und Bioinformatik. Insbesondere profitieren die kleinen und mittelständigen Unternehmen, die an diesem Projekt interessiert sind, von der firmen-, und branchenübergreifenden Kooperation mit Weltfirmen aus dem Mikroskopie- und Pharmabereich.

Projektbegleitender Ausschuss

Unternehmen

- Aesculap AG
- alamedics GmbH & Co. KG
- Becker & Hickl GmbH
- Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG
- Photolase Europe Ltd.
- Richard Wolf GmbH
- Roche Diagnostics GmbH.
- TOPTICA Photonics AG
- Venteon Laser Technologies GmbH
- Volpi Ag
- WITEC
- Carl Zeiss Microscopy

Tab.1: Zusammensetzung des projektbegleitenden Ausschusses.