

Quantitative Biolumineszenz in-vivo

Die makroskopische Beobachtung ausgestrahlter Lumineszenz ist eine Experimentaltechnik, die in verschiedenen Bereichen der Medizin und der Biologie eine weite Verbreitung gefunden hat (Toth et al., 2001; Sölling und Rainov, 2003; Sato et al., 2004). Sie wird speziell in der Krebsforschung eingesetzt, da sie Untersuchungen an kompletten, lebenden Organismen (z.B. Maus, Ratte) ermöglicht, bei denen die induzierten Tumore zuvor mit einer Gen-Sonde (Luciferase-Tag) markiert wurden.

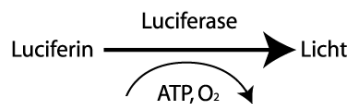


Abb. 1: Bei der Oxidation von Luciferin wird sichtbares Licht freigesetzt.

Biochemischer Hintergrund der Lumineszenz ist die „Glühwürmchenreaktion“ (vgl. Abb. 1): Das Enzym Luciferase katalysiert in Anwesenheit von ATP die Oxidation des Substrats Luciferin. Die dabei freiwerdende Energie wird als Licht des sichtbaren Spektrums abgestrahlt. Zellen, die durch genetische Veränderung das Enzym Luciferase exprimieren, beginnen zu leuchten, wenn in einem lebenden Organismus Luciferin vorhanden ist.

Die Lumineszenztechnik ermöglicht es, Tumorbildung und -entwicklung zeitaufgelöst am individuellen Tier zu beobachten und quantitativ auszuwerten. Durch die Messung am lebenden Tier wird darüber hinaus die statistische Sicherheit erhöht und die Zahl der zur Studie benötigten Tiere minimiert. Da das abgestrahlte Licht tierisches Gewebe einige Zentimeter durchdringen kann, ist die Anwendung bei Mäusen und Ratten nicht auf subkutane Tumoren beschränkt, sondern es können auch Vorgänge im Inneren der Tiere beobachtet werden. Detektiert wird das emittierte Licht in einer lichtdichten Kammer durch eine hochsensitive, rauscharme Kamera, die durch ein mehrstufiges Peltier-



Abb. 2: Visiluxx II von Visitron Systems GmbH.

Element auf -70°C gekühlt wird. Eine spezielle CCD-Architektur (sog. backilluminierter CCD-Chip) erlaubt die Detektion von bis zu 95% des einfallenden Lichts (95% Quanteneffizienz). Zusätzlich minimiert die tiefe Kühlung das thermische Rauschen (Dunkelstrom), durch das sonst bei schwachen Proben und langer Belichtungszeit das Signal im Hintergrund verschwinden würde.

Der Visiluxx II (vgl. Abb. 2) der Firma Visitron Systems GmbH ist eine Komplettlösung für Lumineszenzmessungen: die lichtdichte Kammer ist für Übersichtsaufnahmen zusätzlich mit einer Hellfeldbeleuchtung ausgerüstet und kann optional mit 37°C -Temperaturkontrolle und Fluoreszenzeinheit ausgestattet werden. Die komfortable Software erstellt automatisch Überlagerungen von Hellfeld- und Lumineszenz/Fluoreszenz-Aufnahmen und ermöglicht die quantitative Auswertung der aufgenommenen Daten.

Abb. 3 zeigt ein Anwendungsbeispiel des Visiluxx II. D. Strand und Mitarbeiter untersuchten hierbei den Einfluss des Transkriptionsfaktors *Snail* auf die Metastasenbildung von Tumoren in Mäusen. Dazu wurden Hek293 Zellen mit dem Luciferase-Gen stabil transfiziert und entweder mit einem leeren Vektor (Kontrolle) oder mit einem Vektor mit *Snail*

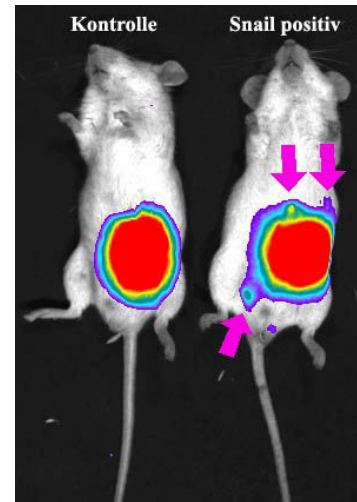


Abb. 3: Zwei Mäuse wurden mit Luciferase markiert, um den Einfluss von *Snail* cDNA auf die Metastasenbildung zu untersuchen. Überlagerung von Hellfeld- und Lumineszenzaufnahme

cDNA (*Snail positiv*) kombiniert. Die Zellen wurden subkutan injiziert und nach 21 Tagen im Visiluxx II gemessen. Deutlich ist zu erkennen, dass beide Tiere starke Lichtemission zeigen, sich also in beiden Tieren ein Tumor gebildet hat. Im Gegensatz zum Kontrolltier ist bei der mit dem *Snail* Tumor transfizierten Maus jedoch sichtbar, dass der Tumor an einigen Stellen (im Bild mit Pfeilen markiert) überdurchschnittlich stark gewachsen ist und durch unregelmäßige Grenzen Hinweise auf Metastasenbildung liefert.

Dr. Wolfgang Feneberg
Visitron Systems GmbH
wfeneberg @ visitron.de

Sato A et al. *In vivo bioluminescence imaging*. Comp. Med. 2004. Vol. 54, pp 631.

Sölling A, Rainov NG, *Bioluminescence imaging in vivo – application to cancer research*. Expert Opin. Biol. Ther 2003. Vol. 3, pp 1163

Strand D., Kashyap A., I. Medizinische Klinik und Poliklinik, Johannes-Gutenberg Universität, pers. Kommunikation 2006

Toth R, et al. *Circadian Clock-Regulated Expression of Phytochrome and Cryptochrome Genes in Arabidopsis*. Plant Phys, 2001, Vol. 127, pp 1607.