

# Dem Energiestoffwechsel von Tumorzellen und Bioreagenzien auf der Spur

Herbert Schneckenburger<sup>1</sup>, Rainer Börret<sup>1</sup>, Claus Braxmaier<sup>2</sup>, Rudolf Kessler<sup>3</sup>, Petra Kioschis<sup>4</sup>, Dietrich Kühlke<sup>5</sup>, Ulrich Mescheder<sup>5</sup>, Werner Schröder<sup>6</sup> und Christoph Nachtigall<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Hochschulen Aalen, <sup>2</sup>Konstanz, <sup>3</sup>Reutlingen, <sup>4</sup>Mannheim, <sup>5</sup>Furtwangen, <sup>6</sup>Offenburg

„ZAFH-PHOTON<sup>n</sup> – PHOTONische Verfahren in neuen Dimensionen“ ist ein Forschungsverbund aus sechs Fachhochschulen und zwei universitären Instituten, der mit industrieller Unterstützung neue photonische Methoden für Messtechnik und Analytik entwickelt. Thematische Schwerpunkte sind die Multidimensionale Mikroskopie sowie die Photonische Sensorik, wobei besonderes Augenmerk auf der einfachen praktischen Anwendbarkeit liegt.

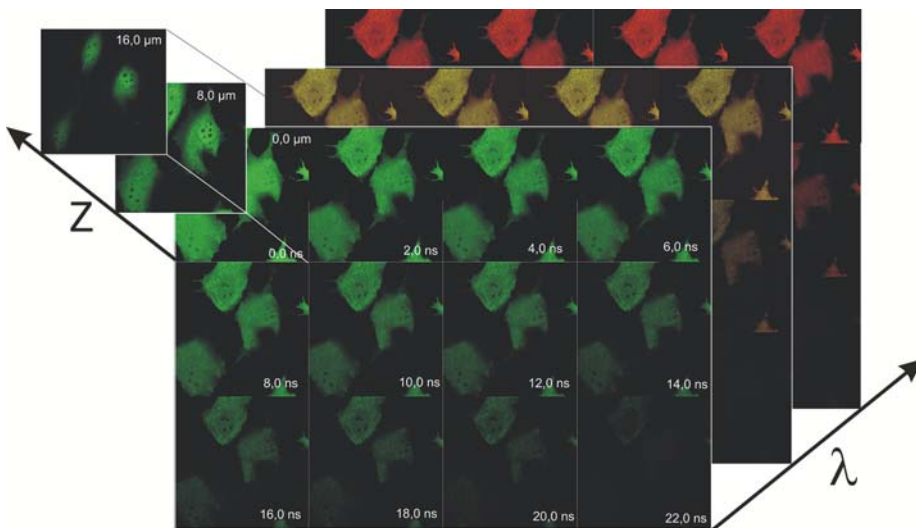
Im Vergleich mit universitären Instituten und Forschungszentren ist das Forschungspotenzial der Fachhochschulen noch relativ wenig erschlossen. Die Flexibilität und Innovationskraft dieser Einrichtungen zu bündeln war daher Ziel der Landesregierung Baden-Württemberg, die mit Unterstützung des Europäischen Regionalfonds

bis in den Nanometerbereich oft mit einer hohen spektralen (Spectral Imaging) und zeitlichen Auflösung (Fluorescence Lifetime Imaging) verbunden (**Bild 1**).

Ziel des hier beschriebenen Forschungsverbundes ist allerdings nicht eine ultimative Auflösung, sondern die einfache praktische Anwendbarkeit der Metho-

xionsmikroskopie [4] sowie die Mikroskopie unter strukturierter Beleuchtung [5] erlauben topographische Aufnahmen mit einer Tiefenaufklärung im Nanometerbereich. Mit diesen Methoden werden unterschiedliche Tumorzellen detailliert untersucht und die Ergebnisse statistisch ausgewertet [6]. Neue Techniken wie die Multivariate Curve Resolution erlauben, vorhandenes Wissen in die Modellbildung zu integrieren. Autofluoreszenzuntersuchungen an spezifischen Coenzymen und möglicherweise auch Messungen der inelastischen Lichtstreuung (Raman-Streuung) lassen auf Unterschiede im Energiestoffwechsel schließen. Besondere Bedeutung erlangt dabei die Kombination der verschiedenen spektroskopischen Methoden in unterschiedlichen Wellenlängenbereichen. Man trägt dabei der Komplexität der Tumorbildung Rechnung.

Um gewonnene Ergebnisse an einzelnen Tumorzellen auf dreidimensionale Zellverbände zu übertragen, wurde ein geeignetes Sphäroidmodell am Institut für Lasertechnologien in der Medizin und Messtechnik an der Universität Ulm etabliert und der Messaufbau – basierend auf der Methode der strukturierten Beleuchtung – an der Hochschule Aalen erstellt. Das Prinzip ist beispielhaft in **Bild 2** für kultivierte Zellen dargestellt, die für 30 Minuten mit dem Fluoreszenzmarker Acridin Orange inkubiert wurden. Hierbei wird ein optisches Gitter in drei unterschiedlichen Positionen in die Zellebene abgebildet (a) und das Schnittbild aus der Fokusebene (b) nach einem beschriebenen Algorithmus [5] errechnet. Dieses Schnittbild zeichnet sich gegenüber dem konventionellen Fluoreszenzbild (c) durch



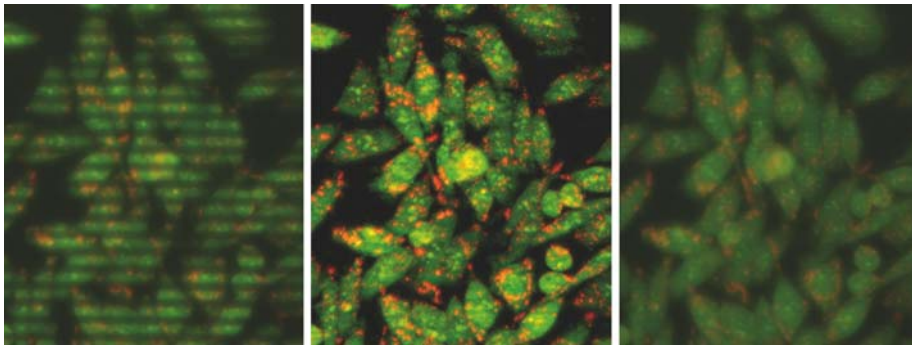
**Bild 1: Prinzip der multidimensionalen Mikroskopie mit räumlicher, spektraler und zeitlicher Auflösung. Die Aufnahme der Einzelbilder erfolgte im Zeitabstand von jeweils 2 ns**

der EU 2008 vier Zentren für Angewandte Forschung (ZAFH) ins Leben rief. Davon ist eines der Photonik gewidmet; es wird von der Hochschule Aalen koordiniert.

## Multidimensionale Mikroskopie

Mikroskopie mit höchster Auflösung ist seit Jahren das Ziel vieler Forscher. Hierbei wird eine laterale und axiale Auflösung

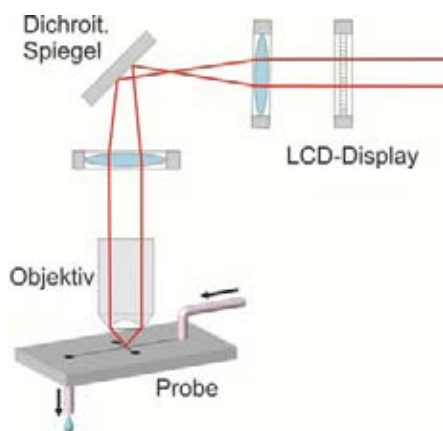
den und insbesondere die Verwendung kleiner Lichtdosen unter Erhaltung der Vitalität lebender Zellen. Hierbei sind Weitfeld-Methoden mit dem Sonnenlicht ähnlichen Bestrahlungsstärken oft den beleuchtungsintensiveren Methoden der Laser-Scanning-Mikroskopie [1,2] oder der Stimulated Emission Depletion Microscopy (STED) [3] überlegen. Insbesondere die winkelaufgelöste Totalrefle-



**Bild 2: Fluoreszenzaufnahmen von kultivierten Zellen nach Inkubation mit dem Fluoreszenzmarker Acridin Orange (5  $\mu\text{M}$ ; 30 min.; Rotfluoreszenz: Lysosomen; Grünfluoreszenz: Zytoplasma und Zellkern); (a) strukturierte Beleuchtung; (b) errechnetes Schnittbild; (c) konventionelles Fluoreszenzbild (Anregungswellenlänge: 470 nm; Messbereich:  $\lambda \geq 515$  nm; Bildgröße jeweils 140 x 160  $\mu\text{m}^2$ )**

seinen Kontrast und seine axiale Auflösung aus. Diese beträgt für die dargestellte Einzelzellschicht 3,4  $\mu\text{m}$  und soll für Tumorzell-Sphäroide auf ca. 10  $\mu\text{m}$  eingestellt werden, um einzelne Zellschichten des Sphäroids selektiv untersuchen zu können.

Das Thema Multidimensionale Mikroskopie schließt auch Methoden der Mikromanipulation mit ein. Gentechnisch veränderte Zellen sollen nicht nur beobachtet, sondern auch mit einer Laserpinzette aus einem Mikrofluidsystem aussortiert werden, um anschließend in hinreichender Zahl für molekularbiologische Untersuchungen (z.B. Polymerase-Kettenreaktion, PCR) zur Verfügung zu stehen. Hierfür wurde ein an der Hochschule Furtwangen hergestellter Mikrochip mit geätzten Kanälen in ein Fluidsystem der Hochschule Aalen integriert und an einen bestehen-



**Bild 3: Einzelzellsortierung mit holographischer Laserpinzette und Mikrofluid-System. Hierbei werden genetisch veränderte Zellen aufgrund ihrer Fluoreszenz erkannt, aus einem Strömungskanal (Querschnitt: 200 x 200  $\mu\text{m}^2$ ) aussortiert und in Mikrokavitäten gesammelt**

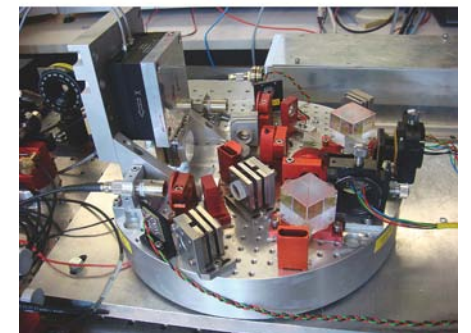
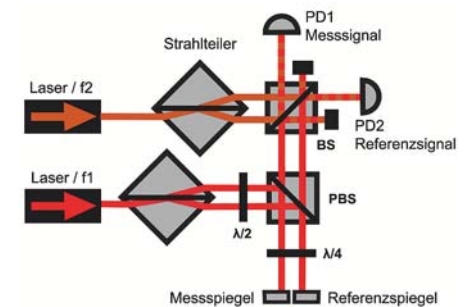
den Aufbau zur Laserpinzette adaptiert. Die bisherige mechanische Steuerung des Laserstrahls soll künftig an der Hochschule Offenburg durch ein holographisches Verfahren mit ansteuerbarem LCD-Display ersetzt werden (Bild 3).

## Photonische Sensorik

Der Schwerpunkt Photonische Sensorik konzentriert sich auf die Weiterentwicklung interferometrischer und spektroskopischer Messverfahren zur hochpräzisen Bestimmung kleinster Längen oder Winkel, zur nicht taktilen Messung von Rauigkeiten oder Materialdefekten und zur Bestimmung kleinster Konzentrationen von Bioreagenzien und Umweltschadstoffen. Einige der Sensoren basieren auf dem Prinzip des Michelson- oder Fabry-Perot-Interferometers. Mit einem an der Hochschule Konstanz weiterentwickelten Michelson-Interferometers (Bild 4) konnten Längen im Picometer- und Winkel im Nanorad-Bereich gemessen werden. Der Sensorkopf wird gegenwärtig miniaturisiert und auf einer thermisch und mechanisch sehr stabilen Glaskeramik aufgebracht. Durch Kombination des hochsymmetrischen Interferometermoduls mit einem temperatureregelten Distributed-Bragg-Reflektor-Laser, einem hochauflösendem Aktuator sowie einer schnellen Datenverarbeitung lassen sich Profilometer-Genauigkeiten im Nanometerbereich erzielen [7].

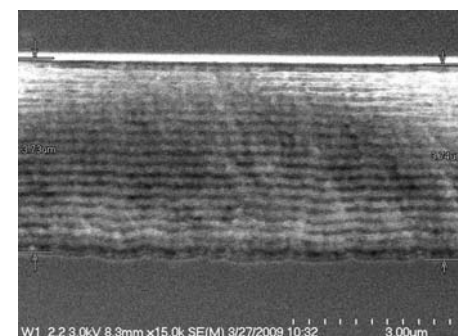
Auf spektroskopischer Basis (IR-Absorption) beruht ein an der Hochschule Furtwangen entwickelter faseroptischer Gassensor zur Bestimmung der Konzentration von Sauerstoff,  $\text{CO}_2$  und Bioreagenzien. Derartige Sensoren beinhalteten bisher oft mehrfach gefaltete Wegstrecken mit einer Gesamtlänge von vielen Metern. Seit der Verfügbarkeit photoni-

scher Hohlfasern (Bandgap-Fasern) kann Licht nun durch periodisch angeordnete Hohlräume in der Faser relativ verlustfrei über längere Strecken geleitet werden. Sind die Hohlräume mit dem nachzuweisenden Gas gefüllt, sind daher lange Absorptionswege und entsprechend hohe Empfindlichkeiten möglich. Außerdem erlauben derartige Fasern einen kleinen Biegeradius und eine entsprechende Miniaturisierung.

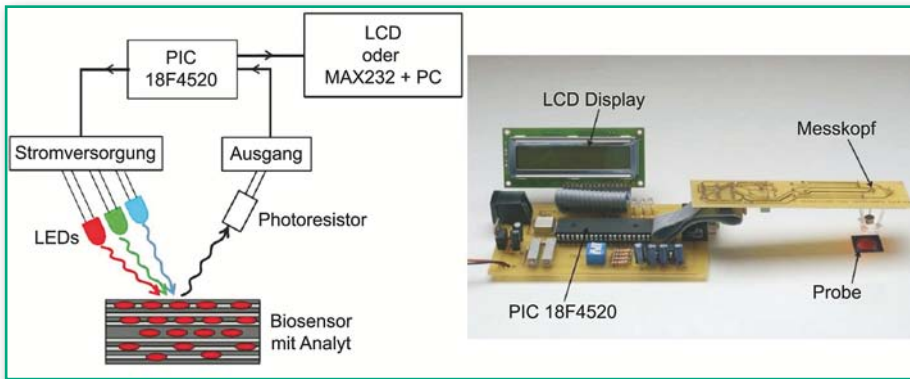


**Bild 4: Prinzip des hochsymmetrischen Heterodyn-Interferometers (oben), Aufbau des Interferometers mit Aktuator (unten)**

Ein weiterer an der Hochschule Furtwangen erstellter Biosensor basiert auf einer sogenannten Multilayer-Struktur, die auf einem Silizium-Chip mit einem elektrochemischen Ätzverfahren realisiert wird. Durch passende Gestaltung der Schichtdicken und der zugehörigen



**Bild 5: Rasterelektronische Aufnahme (Querschnitt durch Schichtsystem) einer Mehrlagenstruktur aus porösem Silizium als Basis für Biosensoren**



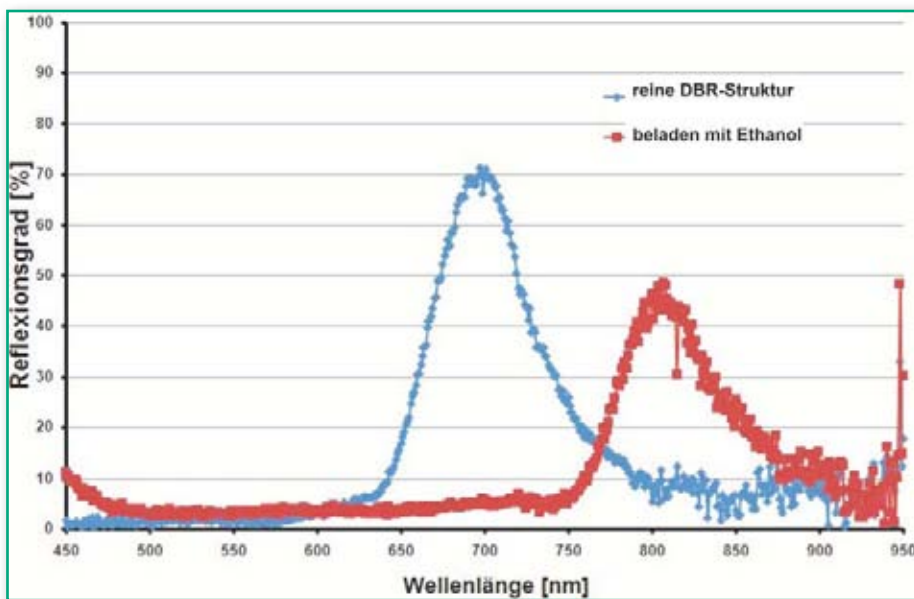
**Bild 6: Messaufbau eines Biosensors**

Brechungsindizes lassen sich optische Filterstrukturen wie Fabry-Perot-Interferometer oder DBR (dielectric bragg reflector) sehr preiswert herstellen. Die dielektrischen Schichten bestehen aus porösem Silizium (**Bild 5**). Werden die Oberflächen des Biochips mit den zu messenden (organischen oder wässrigen) Lösungen benetzt, so füllen sich die sehr feinen Poren, deren Größe im Nanometerbereich liegt (**Bild 6**). Dadurch ändern sich die Brechzahl der Schichten und die damit zusammenhängenden spektralen Eigenschaften der Multilayer-Struktur. So

gemessen werden kann. Somit können mit diesem Ansatz sehr preiswerte Biosensoren realisiert werden, die sich zur Echtzeitanalyse eignen.

## Fazit und Ausblick

Das ZAFH-PHOTON<sup>n</sup> führt Forschergruppen unterschiedlichster Gebiete, wie der Photonik, der Mikrosystemtechnik, der Bildverarbeitung, der Angewandten Chemie und der Biotechnologie zusammen, um photonische Messverfahren für spezielle biologische Fragestellungen zu ent-



**Bild 7: Messergebnis nach Füllen der nm-großen Biosensorporen mit Ethanol: Verschiebung des Reflexionspeaks einer DBR-Struktur durch Ethanol-Befüllung**

kann man z.B. in einer DBR-Struktur eine einfach zu messende spektrale Verschiebung des Reflexionsmaximums beobachten (**Bild 7**). Erste Experimente zeigen, dass sich auf diese Weise verschiedene Alkohole unterscheiden lassen und der Zuckergehalt in Lösungen ebenfalls

wickeln und daraus ableitend mikrotechnische Prototypen für den Einsatz in der Messtechnik und Analytik herzustellen. Mit dem im Rahmen des Forschungsprojektes u.a. weiterentwickelten Michelson-Interferometer für die Optische Kohärenztomographie (OCT) lassen sich sowohl

Oberflächen-Rauigkeiten als auch Tiefendefekte bei der Fertigung optischer Bauteile nachweisen. Einen wesentlichen Fortschritt stellt hierbei der Übergang von einem punktuellen (scannenden) zu einem bildgebenden Nachweissystem dar.

## Danksagung

Die Abteilung Neuropathologie der Universität Heidelberg und das ILM Ulm leisten nicht nur wertvolle Unterstützung bei der Etablierung von Zellsystemen, sondern auch bei der wissenschaftlichen Begleitung des gesamten Vorhabens. Unser Dank gilt ebenfalls der Universität Konstanz für die wissenschaftliche Unterstützung, wie auch den industriellen Partnern Carl Zeiss AG, EADS Astrium GmbH, Roche Diagnostics GmbH und Photonics BW e.V. für ihre kontinuierliche Beratung.

## Literaturhinweise

- [1] J. Pawley, *Handbook of biological confocal microscopy*, Plenum Press, New York, 1990
- [2] W. Denk, J.H. Strickler, W.W. Webb, *Two-photon laser scanning microscope*, Science, Vol. 248, p. 73-76, 1990
- [3] K.I. Willig, B. Harke, R. Medda, S.W. Hell, *STED microscopy with continuous wave beams*, Nat. Methods, Vol. 4(11), p. 915-918, 2007
- [4] M. Wagner, P. Weber, W.S.L. Strauss, H.-P. Lassalle, H. Schneckenburger, *Nanotomography of cell surfaces with evanescent fields*, Advances in Optical Technologies, Vol. 2008, Article ID 254317, 2008
- [5] M.A.A. Neil, R. Juskaitis, T. Wilson, *Method of obtaining optical sectioning by structured light in a conventional microscope*, Opt. Lett., Vol. 22, p. 1905-1907, 1997
- [6] W. Kessler, *Multivariate Datenanalyse in der Pharma-, Bio- und Prozessanalyse*, Wiley-VCH, Weinheim, 2006
- [7] T. Schult, M. Gohlke, R. Spannagel, S. Ressel, D. Weise, U. Johann, C. Braxmaier, *Sub-nanometer heterodyne interferometry and its application in dilatometry and industrial metrology*, Int. J. Optomechatronics, Vol. 3(3), 2009

## Kontakt

Prof. Herbert Schneckenburger  
Sprecher des ZAFH-PHOTON<sup>n</sup>  
Institut für  
Angewandte Forschung  
Hochschule Aalen  
Anton-Huber-Str. 21  
73430 Aalen  
Tel.: 07361/5763401  
herbert.schneckenburger@htw-aalen.de

