

Forschungsergebnisse

# Optische Technologien

der Baden-Württemberg Stiftung gGmbH

# Markerfreie Mikroskopie für die Tumordiagnostik und Tumordifferenzierung

Im Rahmen des Forschungsprogramms „Optische Technologien“ der Baden-Württemberg-Stiftung gGmbH zum Schwerpunkt „Markierungsfreie optische Diagnostikverfahren“ erforschten Arbeitsgruppen der Hochschulen Aalen und Mannheim unter der Leitung von Prof. Dr. Herbert Schneckenburger und Prof. Dr. Petra Kiochis neue Methoden der markerfreien

und teilweise auch klinisch genutzt. Sie basieren aber entweder auf einem Vergleich von Zellen mit ganz verschiedener Funktion oder von Gewebetypen mit unterschiedlichen optischen Eigenschaften. So können beispielsweise die unterschiedliche Absorption oder Lichtstreuung verschiedener Gewebe auch zu einer Änderung des Fluoreszenzsignals führen, ohne dass es sich

zellbiologischem Schwerpunkt und einer Arbeitsgruppe mit optischem Schwerpunkt von Bedeutung. So erfolgte die Etablierung der zwei- und dreidimensionalen Zellsysteme sowie deren Charakterisierung hinsichtlich ihrer Vitalität, Proliferation und Migration an der Hochschule Mannheim, während spektroskopische und mikroskopische Untersuchungen zur Autofluoreszenz, zur Raman-Streuung und zur Oberflächen-Topologie an der Hochschule Aalen durchgeführt wurden. Diese Untersuchungen wurden durch Messungen der Hochschule Mannheim mit der Zweiphotonen-Mikroskopie ergänzt.

Abhängig von der Anregungswellenlänge tragen verschiedene Pigmente und Coenzyme (u.a. NADH, Flavine, Lipofuscin) zur Eigenfluoreszenz der Zellen bei. Bei Anregung im nahen ultravioletten Spektralbereich dominieren vor allem die Emissionsbanden von protein-gebundenem und freiem Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NADH) mit Maxima bei 440 nm und 480 nm. Wie Abbildung 1 zeigt, sind diese Banden bei U251-MG Glioblastomzellen (Kontrollen, schwarz) annähernd gleich stark ausgeprägt, während bei den genetisch veränderten Mutanten (U251-MG mit den Tumor-Suppressorgenen TP53, rot, bzw. PTEN, grüne Kurve) die Bande bei 440 nm dominiert. Ein höherer Anteil von Protein-gebundenem in Vergleich zu freiem NADH wurde generell für die genetisch veränderten (und weniger malignen) Zellen im Vergleich zu den Tumorzellen (Glioblastomzellen) gefunden und auf einen höheren Beitrag der Atmung zum Energiestoffwechsel (im Vergleich zur anaeroben Glykolyse) zurückgeführt. Diese Beobachtung wurde durch Messungen der Fluoreszenzabklingkinetik unterstützt, die Zeitkonstanten von  $\tau_1 = 0,4 - 0,5$  ns (freies NADH) und  $\tau_2 = 2,3 - 2,8$  ns (gebundenes NADH) aufwies

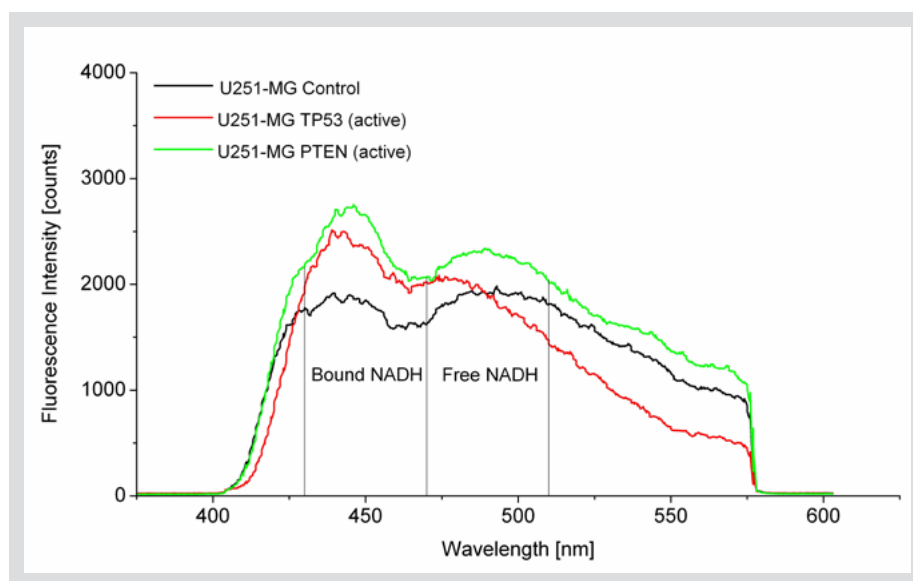


Abbildung 1: Autofluoreszenzspektren von U251-MG Glioblastomzellen (Kontrollen sowie Zellen mit aktivierten Suppressorgenen TP53 bzw. PTEN) nach optischer Anregung im nahen ultravioletten Spektralbereich (375 nm)

Mikroskopie für die Tumordiagnostik und Tumordifferenzierung. Ziel war es, einen Beitrag zur Fragestellung zu leisten, inwiefern sich Tumorzellen und weniger bösartige Zellen mit optischen Methoden unterscheiden lassen, ohne sie mit Fluoreszenzfarbstoffen oder anderen Substanzen zu markieren. Dies ist vor allem im Hinblick auf eine spätere klinische Anwendung wichtig, wo die Verwendung derartiger Marker umfangreiche Studien und aufwändige Zulassungsverfahren erfordern würde.

Arbeiten zur Unterscheidung verschiedener Zell- und Gewebetypen über deren Eigen- oder Autofluoreszenz werden seit über 20 Jahren durchgeführt

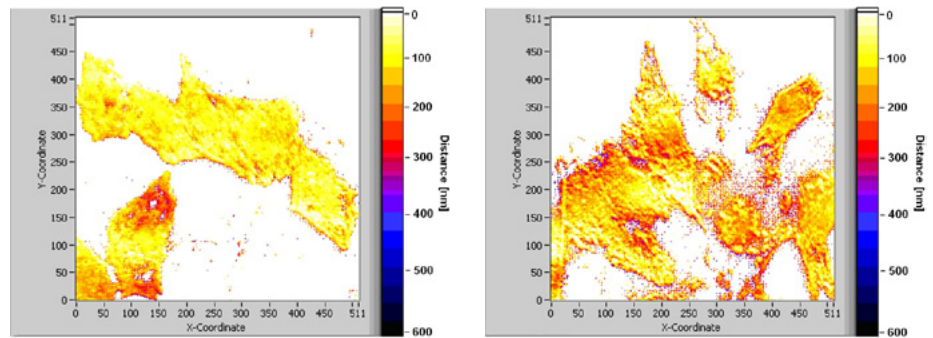
um Tumor-spezifische Effekte handelt. Um daher eine systematischere Unterscheidung zwischen Tumorzellen und weniger malignen Zellen zu treffen, wurden im vorliegenden Projekt erstmals so genannte isogene Zellsysteme verwendet. Hierbei wurden Krebszellen (Glioblastomzellen, Brustkrebszellen) mit Zellen verglichen, die genetisch verändert und damit weniger bösartig waren. Kontrollzellen und genetisch veränderte Zellen zeichnen sich durch dieselbe Morphologie, aber einen unterschiedlichen Zellstoffwechsel aus.

Für die Durchführung des Forschungsvorhabens war die Zusammenarbeit einer Arbeitsgruppe mit molekular- und

und innerhalb dieser Grenzen eine Zunahme von 2 für die weniger malignen Zellen ergab.

Eine weitere Möglichkeit, Tumorzellen und weniger maligne Zellen zu unterscheiden, bietet die Raman-Spektroskopie. Hier werden über die inelastische Lichtstreuung Schwingungsbanden charakteristischer Moleküle detektiert. Allerdings müssen die  $10^6$  bis  $10^8$ -mal stärkere elastische Streuung sowie das direkt durch die Probe tretende Anregungslicht wirkungsvoll unterdrückt werden, was mit geeigneten Spektrometern und Spektralfiltern (z.B. Notch-Filter) sowie einer günstigen Strahlführung erfolgen kann. Mit den im Rahmen eines vorangegangenen Projekts erstellten Aufbauten zur Hellfeld- und Dunkelfeld-Raman-Mikroskopie wurden nun vor allem im Bereich von  $800 - 1200 \text{ cm}^{-1}$  charakteristische Raman-Linien mit Unterschieden zwischen U251-MG Glioblastomzellen und weniger malignen Zellen (Suppressorgene TP53 bzw. PTEN) detektiert. Durch eine Kombination von Phasenkontrast-Mikroskopie und Raman-Imaging ließen sich diese Raman-Signale definierten zellulären Strukturen zuordnen.

In einem weiteren Experiment wurden die U251-MG Glioblastomzellen und ihre Mutanten mit dem Membranmarker Laurdan inkubiert und unter Totalreflexionsbedingungen beleuchtet. Durch Variation des Einstrahlwinkels gelang es hierbei, die Eindringtiefe des evaneszenten elektromagnetischen Feldes kontinuierlich zu variieren und daraus die Zell-Substrat-Topologie bzw. die Zelladhäsion im Nanometerbereich zu bestimmen. Abbildung 2 belegt den Unterschied zwischen U251-MG Glioblastomzellen und Zellen mit aktiviertem Tumor-Suppressorgen TP53. Während die Zellen im ersten Fall ziemlich flach mit einem mittleren Abstand von ca. 100 nm auf dem Substrat aufliegen, findet man im zweiten Fall fokale Kontakte zum Substrat und Abstände bis ca. 300 nm in unmittel-



**Abbildung 2:** Zell-Substrat-Topologie von U251-MG Glioblastomzellen im Abstandsbereich von 0 - 600 nm (Farbskala: weiß – schwarz) nach Inkubation mit Laurdan; (links) Kontrollzellen; (rechts) Zellen mit aktiviertem Suppressorgen TP53; Anregungswellenlänge: 391 nm, Messbereich:  $\geq 420$  nm; Bildgröße:  $210 \mu\text{m} \times 210 \mu\text{m}$ .

barer Nachbarschaft. Somit ergibt sich ein weiteres Kriterium zur Unterscheidung von Tumorzellen und weniger malignen Zellen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass über Messungen der Autofluoreszenz, der Raman-Spektren sowie der Oberflächen-Topologie eine Unterscheidung von Krebszellen und weniger malignen Zellen möglich erscheint. Hierbei unterstützen bildgebende Verfahren (Spectral Imaging, Fluorescence Lifetime Imaging) und multivariate statistische Methoden die Auswertung und Interpretation der gemessenen Daten erheblich. Allerdings differieren die Unterschiede zwischen Tumorzellen und weniger malignen Zellen erheblich für die einzelnen Zellsysteme – sie sind im Glioblastom-Zellsystem wesentlich ausgeprägter als beispielsweise bei MCF-7 Brustkrebszellen. Dies erschwert es, allgemein gültige Aussagen für die Tumordiagnostik zu treffen, zumal Gewebe-spezifische Parameter wie die extrazelluläre Fluoreszenz von Kollagen oder elastischen Fasern sowie die elastische Lichtstreuung bisher unberücksichtigt bleiben. Trotzdem sind die Projektpartner davon überzeugt, dass sie wertvolle Grundlagen und Methoden für weitere wissenschaftliche Arbeiten zur Tumorerkennung, für die Entwicklung geeigneter Geräte und nicht zuletzt auch für eine künftige klinische Anwendung geschaffen haben.

#### Kontakt:

Prof. Dr. Herbert Schneckenburger  
Studiengang Optoelektronik

Hochschule Aalen  
Beethovenstraße 1  
73430 Aalen

Tel.: 07361 / 576-3401

herbert.schneckenburger  
@htw-aalen.de

Prof. Dr. Petra Kioschis  
Institut für Molekular- und  
Zellbiologie (MZB)

Hochschule Mannheim  
Paul-Wittsackstraße 10  
68163 Mannheim

Tel.: 0621 / 2926523

p.kioschis@hs-mannheim.de