

Synchrotron-Infrarot-Mikrospektroskopie an lebenden Zellen

D. Moss, ISS; M. Keese, Universitätsklinikum Mannheim;
R. Pepperkok, European Molecular Biology Laboratory Heidelberg

Einleitung

Nachdem die Infrarot-Spektroskopie sich erfolgreich als Methode für strukturelle Untersuchungen von biologischen Molekülen etabliert hat, richtete in den vergangenen Jahren die Gemeinde der Biospektroskopiker ihr Augenmerk auf die Erforschung von Zellen und Geweben. Hierbei ist der Ansatz wie folgt: Mit der Infrarotspektroskopie lassen sich sämtliche chemischen Verbindungen sichtbar machen, daher muss das Infrarotspektrum eines sehr komplexen chemischen Systems wie eine biologische Zelle eine Summenfunktion der zellulären Chemie darstellen. Dabei sind Unterschiede im Verhalten, Zustand, Gesundheit bzw. Krankheit bei Zellen und Geweben grundsätzlich immer auf Unterschiede der zellulären Chemie zurückzuführen. Demzufolge müssen solche physiologisch und klinisch wichtige Unterschiede durch Vergleiche der jeweiligen Infrarotspektren erkennbar sein.

Selbstverständlich sind solche spektralen Unterschiede in den Infrarotspektren von Zellen sehr subtil – im Großen und Ganzen ist von der Chemie her auch eine sterbende oder an Krebs erkrankte Zelle immer noch eine Zelle. Dennoch hat sich gezeigt, dass die Auswertung der Spektren mit Hilfe ausgeklügelter mathematischer Mustererkennungs-Algorithmen zu viel versprechenden Ergebnissen führen kann. Diese Ergebnisse deuten auf weitreichende Anwendungsmöglichkeiten in der biologischen Forschung sowie in den Gebieten der Gewebeerkenntnis, Diagnose von Krankheiten und

Klassifizierung von Bakterienstämmen hin [1,2].

Das Synchrotron als Infrarotlichtquelle ist für solche Messungen geradezu ideal, da sie eine räumliche Auflösung bietet, die die Messung einzelner Zellen ermöglicht. Bei Messungen mit herkömmlichen Laborgeräten wird typischerweise ein Messfleck von 100 bis 200 μm benötigt, um genügend Licht für die spektroskopischen Messungen durch die biologische Probe zu kriegen. So werden viele Zellen gleichzeitig gemessen und das erhaltene Spektrum stellt den Durchschnitt über alle Zellen dar. Das hat aber den Nachteil, dass bei einer heterogenen Population der Durchschnitt allein ein sehr verzerrtes Bild wiedergeben kann, weil die biologisch wichtigen intra-individuellen Unterschiede untergehen (statistisch gesehen hat ja der Durchschnittsmensch eine Hode und eine Brust!). Am Synchrotron, dank seiner effektiven Lichtquellenstärke im Mikrometerbereich und Strahldivergenz von weniger als 1° , kann das Infrarotlicht verlustfrei auf eine 5 μm große Probenfläche fokussiert werden. Die erreichbare Lichtintensität auf einem solch minimalen Messfleck ist bis zu 1000 mal höher als mit einem herkömmlichen Laborgerät und liefert Spektren mit hervorragendem Signal-Rausch-Verhältnis bei Messzeiten im Sekundenbereich [3].

Über Infrarotmessungen von einzelnen Zellen mit Synchrotronlicht wurde bereits berichtet, z.B. an den U.S.-amerikanischen Synchrotrons ALS in Kalifornien [4] und NSLS in New York [5]. Allerdings handelte es sich hierbei –

wie auch bei bisherigen Messungen mit herkömmlichen Laborgeräten – um getrocknetes bzw. fixiertes Probenmaterial. Ziel unserer Studie an ANKA war es, eine biologisch relevantere Infrarot-Messmethode für einzelne *lebende* Zellen zu entwickeln. Das bedeutet, die Zellen müssen sich auch während der Messung in wässrigem Kulturmedium befinden und durch dieses Wasser hindurch muss spektroskopiert werden. Wegen der starken Hintergrundabsorption des Wassers im Infrarotbereich ist dies zwar eine große experimentelle Herausforderung, die Vorteile sind aber klar ersichtlich: Mögliche Artefakte werden vermieden und dadurch die Bedeutung für die biomedizinische Forschung gesichert, spektrale Änderungen in Antwort auf Einflüsse wie Drogen oder Umweltgifte können in Echtzeit verfolgt werden und somit wird beim Vergleich einer behandelten Zelle mit einer unbehandelten Kontrollzelle der potentielle Unsicherheitsfaktor der intra-individuellen Unterschiede eliminiert. Wie bei der Methode der Differenzspektroskopie für isolierte Biomoleküle [6-8] kann somit erreicht werden, dass subtile spektrale Unterschiede mit größtmöglicher Sicherheit und Präzision erfasst werden können.

Messmethoden

Die Experimente wurden am Infrarotmikroskop des Strahlrohrs ANKA-IR durchgeführt (Abb. 1). Dieses Strahlrohr nutzt die Synchrotron-Kantenstrahlung, eine neue Methode um die Strahlung eines relativistischen Elektronenstrahls von noch höherer Brillanz zu erhalten als dies von herkömmli-

chen Synchrotronquellen erzielt werden kann [9].

Es wurden verschiedene Arten von menschlichen Darmkrebszellen (HT29, SW-480, WIDR, CaCo2)

sowie als gesunde Kontrollen menschliche Fibroblasten (Primärkulturen) und Endothelzellen aus menschlichen Nabelschnurvenen untersucht. Diese Krebs- und ge-

sunden Zellen wurden sowohl in konfluenten als auch nicht-konfluenten Kulturen untersucht. Die Zellkulturen wurden ca. 24 Stunden vor den Messungen auf 32 x 3 mm große CaF₂-Fenster etabliert und bei 37°C inkubiert. Unmittelbar vor den Messungen wurden die inzwischen mit gut haftenden Zellkulturen belegten Fenster in eine handelsübliche zerlegbare Durchflussküvette montiert. Mit Hilfe eines Teflon-Abstandhalters wurde die Schichtdicke der Küvette auf 11 bis 12 µm eingestellt. Während den Infrarotmessungen wurden die Zellen bei 35°C gehalten und mit einem kontinuierlichen, langsamen Kulturmediumfluss versorgt (230 µl pro Stunde). Die Aufnahme eines Infrarotspektrums erfolgte durch Blenden von 20 bis 30 µm Durchmesser und dauerte ca. 30 Sekunden.

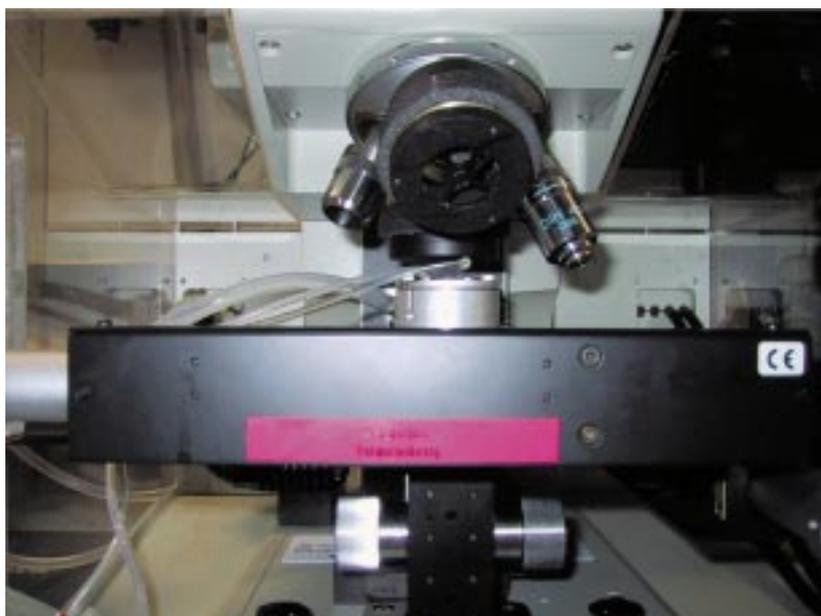


Abb. 1: Experimenteller Messaufbau am ANKA-IR Strahlrohr. Oben (links nach rechts): FTIR-Spektralphotometer, Durchflusstemperierbad, Schlauchquetschpumpe für die Mediumversorgung, IR-Mikroskop. Unten: Nahaufnahme der IR-Durchflussküvette am XY-Tisch des IR-Mikroskops.

An dieser Stelle möchten wir anmerken, dass sich das Synchrotron-Infrarotlicht weder toxisch noch erbgutschädigend auf lebende Zellen auswirkt. Die Strahlung verursacht auch keine Hitzeschäden, wie am ALS-Synchrotron durchgeführte Experimente [10] belegt haben. Als Beweis für die Lebensfähigkeit der Zellen während der hier berichteten Messungen kann man anmerken, dass Zellbewegungen und -teilungen während der mehreren Stunden andauernden Experimente beobachtet wurde.

Ergebnisse und Diskussion

Erstes experimentelles Ziel war, die Reproduzierbarkeit von Messungen unbehandelter Zellen über einen längeren Zeitraum zu sichern.

Dazu wurden mit Hilfe des motorisierten XY-Tisches am Infrarotmikroskop je Kultur 10 verschiedene Zellen wiederholt gemessen (siehe Abb. 2). Über eine Gesamtzeit von 2 Stunden wurde jede Zelle im 24-Minutentakt gemessen. Vor jeder dieser Messungen wurde ein Referenzspektrum an einem benachbarten zellfreien Bereich aufgenommen, um die langsame Intensitätsabnahme des Synchrotronstrahls zwischen den Elektronen-Injektionen zu kompensieren. Ein typisches Messergebnis hierzu wird in Abb. 3 dargestellt.

Als erstes sei auf die sehr hohe Qualität der aufgenommenen Spektren hingewiesen, welche trotz der starken Hintergrundabsorption des Wassers erreicht werden konnte. Die erhaltenen Spektren sind in guter Übereinstimmung mit den vielen publizierten Spektren von Zellen und Geweben und zeigen die typischen Absorptionsbanden, die den Proteinen, Nucleinsäuren und Lipiden zugeordnet werden können.

Die Daten zeigen sehr anschaulich, welche gute Reproduzierbarkeit mit diesem Experimentaufbau erzielt werden konnte. Es traten deutliche intra-individuelle Unterschiede zwischen den Zellen auf, die deutlich größer als die Standardabweichungen für die wiederholte Messungen an einer einzelnen Zelle sind. Dies bestätigt auch, dass die Positionierung auf der XY-Plattform des Bruker IR-Mikroskops in hohem Maße reproduzierbar und während der mehrstündigen Dauer des Experimentes auch die Position des Synchrotronstrahls ausreichend stabil war.

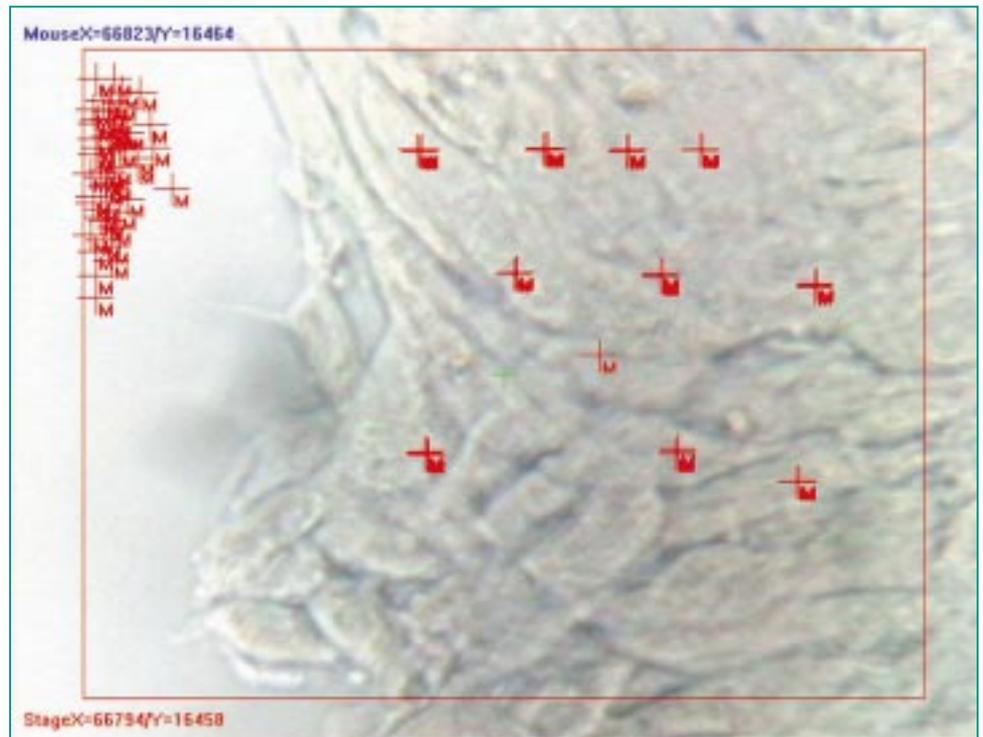


Abb. 2: Zellkultur (hier: Konfluente Kultur von menschlichen Fibroblasten) durch das IR-Mikroskop gesehen. Die Gesamtbildgröße entspricht 280 x 210 μm . Die mit ‚M‘ gekennzeichnete Kreuze stellen die ausgewählten Messpositionen dar. Zehn dieser Positionen sind mehrfach ausgewählt, um die jeweils betroffene Zelle wiederholt zu messen. Am linken Bildrand sieht man die ausgewählten Referenzmesspositionen im benachbarten zellfreien Bereich.

In weitergehenden Experimenten wurde detailliert auf die oben erwähnten intra-individuellen Unterschiede eingegangen. In mehreren unabhängigen Kulturen von jedem Zelltyp wurden Spektren der einzelnen Zellen in Gruppen von 50 aufgenommen. Auch hier wurde das Verfahren angewandt, Referenzspektren von benachbarter zellfreier Lösung für jede Messung zu erstellen. Als eine einfache Analyse der Varianz innerhalb dieser Daten wurden die Ausschläge der Amid-II-Bande des Proteins (definiert als der vertikale Abstand zwischen dem Maximum bei 1545 cm^{-1} und dem Minimum bei 1475 cm^{-1}) in jedem Satz von Ein-

zelzell-Spektren gemessen und grafisch als Frequenz-Plot (Abb. 4) dargestellt.

Für die menschlichen Darmkrebszelllinien HT29, CaCo2 und SW-480 erschien die Verteilung der Amid-II-Intensität mit einer sehr schmalen normalen Verteilung als beständig. Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass hier der Mittelwert alleine genügen würde, um diese Populationen zu beschreiben. Jedoch zeigte die Amid-II-Intensität bei dem WIDR-Zelltypus klare Hinweise, dass mindestens zwei verschiedene Populationen vorhanden waren. Hätte man sich bei diesen Messungen ausschließlich auf eine Mittelung

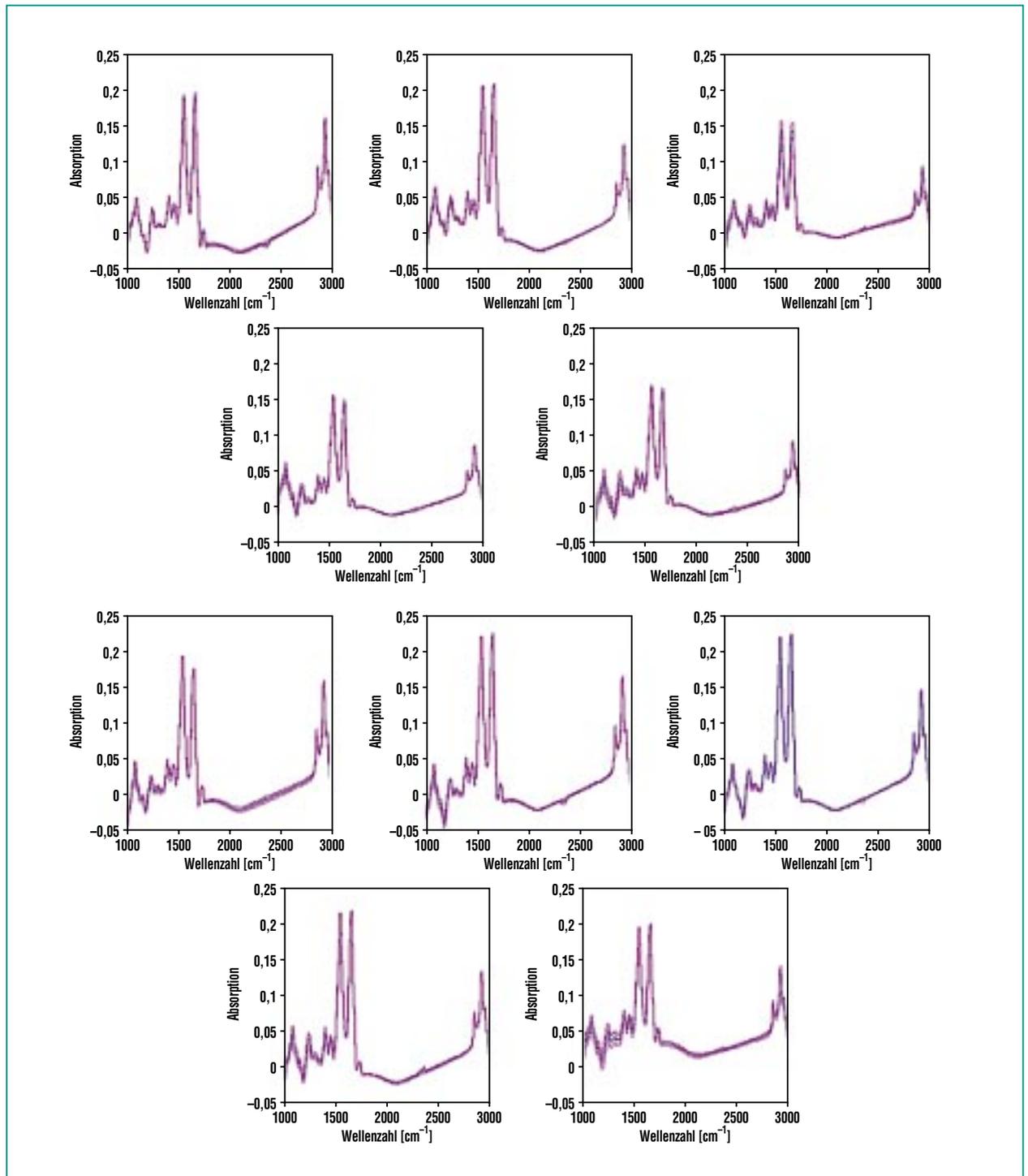


Abb. 3: Reproduzierbarkeit von wiederholten Messungen der Infrarotspektren von einzelnen lebenden menschlichen Fibroblasten. Mit Hilfe des motorisierten XY-Tisches des IR-Mikroskops wurden 10 verschiedene Zellen in konfluenter Kultur wiederholt in den IR-Strahl gebracht und gemessen. Eine Blende mit 30 μm Durchmesser wurde verwendet, um den Messstrahl auf eine Zelle einzuschränken. Jedes Diagramm zeigt den Mittelwert (blau) \pm Standardabweichung (rot) für eine Zelle.

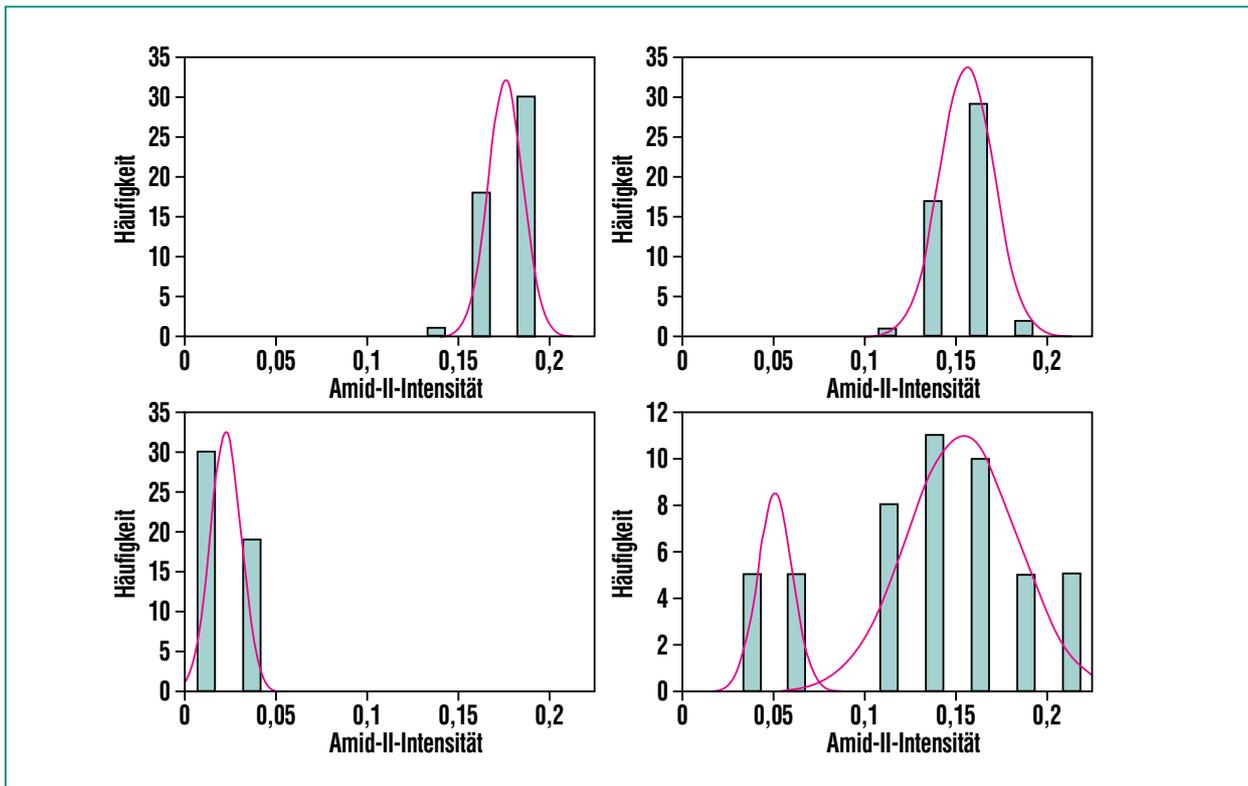


Abb. 4: Intra-individuelle Varianz in den Infrarotspektren von Darmkrebszellen. Eine Blende mit 20 µm Durchmesser wurde verwendet, um den Messstrahl auf eine Zelle einzuschränken. Je 50 Messungen an Einzelzellen wurden durchgeführt. Aufgetragen wird die Verteilung der Intensität der Amid-II-Bande. Oben links, HT29-Zellen; oben rechts, CaCo2-Zellen; unten links, SW-480-Zellen; unten rechts, WIDR-Zellen.

der Messung verlassen, um eine Mustererkennungs-Software zu trainieren, hätte dies sehr leicht zu irreführenden Ergebnissen führen können. Bei diesem Beispiel wären also die Messungen von einzelnen Zellen für die Charakterisierung der Zellpopulation und der verlässlichen Unterscheidung von anderen Zelltypen essentiell notwendig.

Wie bereits eingangs erwähnt, galt als ein vorrangiges Interesse der Autoren die Möglichkeit, spektrale Änderungen von einzelnen Zellen in Antwort auf entsprechende Stimuli in Echtzeit aufzunehmen. Die hier gezeigten Daten bestätigen

die Durchführbarkeit solcher Experimente und zeigen, dass relativ kleine spektrale Änderungen über längere Zeiträume (mehrere Stunden) erfasst werden können. In Ansätzen wurden bereits solche Experimente durchgeführt, z.B. mit H_2O_2 als direktes Oxidationsmittel der Protein-Sulfhydrylgruppe wie auch mit dem Phosphatase-Inhibitor Vanadat. Spektrale Veränderungen konnten beobachtet werden, die aber noch auf Reproduzierbarkeit und Gültigkeit hin ausgewertet werden müssen. Die Ergebnisse werden in einer zukünftigen Veröffentlichung vorgestellt werden.

Schlussfolgerung

Die von uns erhaltenen Daten belegen die Möglichkeit, Infrarotspektren von einzelnen lebenden Zellen in wässrigem Kulturmedium mit guter Präzision und Reproduzierbarkeit aufzunehmen. Dabei handelte es sich vorerst lediglich um eine Machbarkeitsstudie, die dennoch bei der Vorstellung gegenüber der internationalen Biospektroskopie-Gemeinde [11-14] auf eine erfreulich reges Interesse gestoßen ist.

Der Ansatz ist auch zeitgemäß. Seit mehr als einem Jahrhundert haben Biologen die Physiologie

von Organismen, Organen und Zellen erforscht und versucht, diese Systeme in ihrer Gesamtheit zu verstehen, während Biochemiker die einzelnen biologischen Moleküle in gereinigter Form studierten und daraus ein Verständnis von Lebensprozessen synthetisieren wollten. Die Herausforderung für das 21. Jahrhundert wird sein, diese zwei Vorgehensweisen zusammen zu bringen. Die hier vorgestellte Messmethode, die die Chemie in lebenden Zellen in Echtzeit verfolgen lässt, könnte signifikant dazu beitragen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass diese ersten Daten unserer noch anhaltenden Studie viel versprechend sind. Wir sind optimistisch, dass dieser Ansatz ein potentiell nützliches Werkzeug sowohl für die Forschung als auch für die klinische Diagnostik darstellt.

Danksagung

Der Autor, D. A. Moss, möchte Prof. Max Diem und seinen Kollegen für die anregende Diskussion über diese Ergebnisse danken –

wie auch seinen Teamkollegen Dr. Yves-Laurent Mathis und Dr. Biliana Gasharova für ihre sehr wertvolle Zusammenarbeit bei der Entwicklung der IR-Mikroskopie-Messstation an ANKA. Ebenfalls herzlichen Dank an Frau Annette Böttcher / IMK-ASF für die fachgerechte Übersetzung der englischen Vorlage.

Literatur

- [1] H.H. Mantsch, D. Chapman (Hrsg.), *Infrared Spectroscopy of Biomolecules*, Wiley-Liss, Toronto, 1996
- [2] J.M. Chalmers, P.R. Griffiths (Hrsg.), *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, Vol. 5, John Wiley, Chichester, 2002
- [3] W.D. Duncan, G.P. Williams, *Appl. Opt.* 22 (1983) 2914.
- [4] H.-Y.N. Holman, R. Goth-Goldstein, M.C. Martin, M.L. Russell, W.R. McKinney, *Env. Sci. Technol.* 34 (2000) 2513
- [5] L. Miller, P. Dumas, N. Jamin, J.L. Teillaud, J. Miklossi, L. Forro, (2002) *Rev. Sci. Instrum.* 73, 13571
- [6] W. Mäntele, (1993) *Trends Biochem. Sci.* 18, 197
- [7] F. Siebert, (1995) *Methods Enzymol.* 246, 501
- [8] D.A. Moss, K. Fuchsle, R. Masuch, A. Wolf, (2000) *SPIE Proc.* 3918, 97
- [9] Y.-L., Mathis, P. Roy, B. Tremblay, A. Nucara, S. Lupi, P. Calvani, A. Gerschel, (1998) *Phys. Rev. Lett.* 80, 1220
- [10] H.-Y.N. Holman, M.C. Martin, W.R. McKinney, (2003) *J. Biol. Phys.* 29, 275
- [11] M. Keese, R. Pepperkok, D.A. Moss, (2003) *1st Workshop on Biological Applications of Synchrotron Infrared in Europe*, Karlsruhe, 11.-12. September 2003
- [12] D.A. Moss, M. Keese, R. Pepperkok, (2004) *3rd International Conference 'Shedding New Light on Disease'*, Newark, U.S.A., 19.-24. Juni 2004
- [13] D.A. Moss, M. Keese, R. Pepperkok, (2004) *FTIR Spectroscopy in Microbiological and Medical Diagnostics*, Berlin, 21.-22. Oktober 2004
- [14] D.A. Moss, M. Keese, R. Pepperkok, (2005) *Vib. Spectrosc.* 38, 185