



# Fitnessstest von frei beweglichen Zellen

Markierungsfreie und nicht invasive Raman-Trapping-Mikroskopie

Florian Zunhammer<sup>1</sup>, Dr. Heidi Kremling<sup>1</sup>, Dr. Tanja Buchacher<sup>2</sup>,  
Dr. Torsten Tonn<sup>3</sup>, Dr. Roland Werk<sup>4</sup>, Dr. Karin Schütze<sup>1</sup>

<sup>1</sup> CellTool GmbH, Bernried, Deutschland

<sup>2</sup> Donau Universität Krems, Zentrum Biomedizinische Technologie, Krems, Österreich

<sup>3</sup> Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus, Technische Universität Dresden, Deutschland  
Institut für Transfusionsmedizin Dresden, DRK-Blutspendedienst Nord-Ost

<sup>4</sup> Babende Institut für medizinisch-mikrobiologische Forschung, Würzburg, Deutschland

Die Analyse von einzelnen Zellen ist nie einfach. Und es wird noch schwieriger, wenn die Zellen nicht auf einer Oberfläche fixiert sind, sondern sich frei bewegen. Hier schafft eine neue, innovative Technologie Abhilfe. Die Raman-Trapping-Mikroskopie fixiert frei bewegliche Proben während der Spektralanalyse und ermöglicht so neue Einsichten in Merkmale und Verhalten von eukaryotischen Zellen und Mikroorganismen.

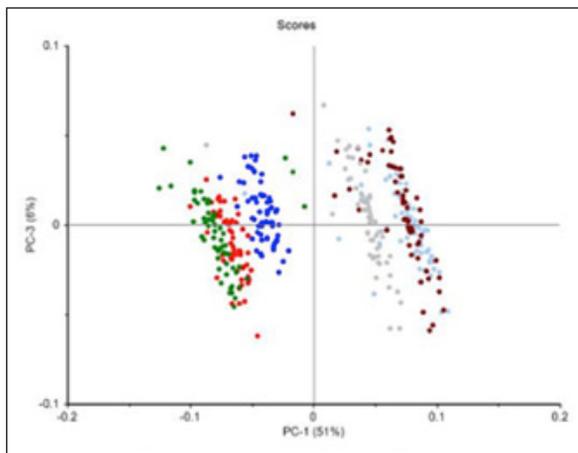
Die Raman-Spektroskopie ist ein analytisches Verfahren, das ausschließlich auf der Interaktion von Molekülen mit Licht beruht. Diese Interaktionen erzeugen einen Fingerabdruck, dessen Spektrum für jeden Zelltyp einzigartig ist. Der Einsatz von optischen Pinzetten ermöglicht ein Halten und Manipulieren von kleinen Partikeln und frei beweglichen Proben. Die Kombination aus Raman-Spektromikroskopie und optischer Pinzette erlaubt damit eine effiziente Analyse von frei beweglichen eukaryotischen Zellen und Mikroorganismen [1] – markierungs- und zerstörungsfrei.

## Es gibt zwei Möglichkeiten um Partikel optisch einzufangen:

I. Partikel können in einem Stretcher gefangen werden, in dem zwei divergente, sich in Gegenrichtung ausbreitende Laserstrahlen optische Pinzetten bilden [2]. Diese Art von Falle erfordert keine hochwertige Optik und überträgt nur wenig Energie auf den gefangenen Partikel [3].

II. Eine optische Einzelstrahlfalle liefert eine ausreichend große Kraft, um kleine Partikel wie Viren, Bakterien und Organellen zu halten und zu bewegen, ohne die gefangene Probe zu zerstören [4, 5].

Letztere Anordnung ist im BioRam<sup>®</sup>-System (CellTool, Bernried, Deutschland) verwirklicht, bei dem der Raman-Anregungslaser so konfiguriert ist, dass er gleichzeitig das Fangen von Partikeln und das Erfassen von Raman-Spektren ermöglicht. Da ein kombiniertes Raman-Trapping-Mikroskop nicht invasiv und unter physiologischen Bedingungen funktioniert, bleiben die Zellen vital und können nach der Analyse weiter verwendet werden.

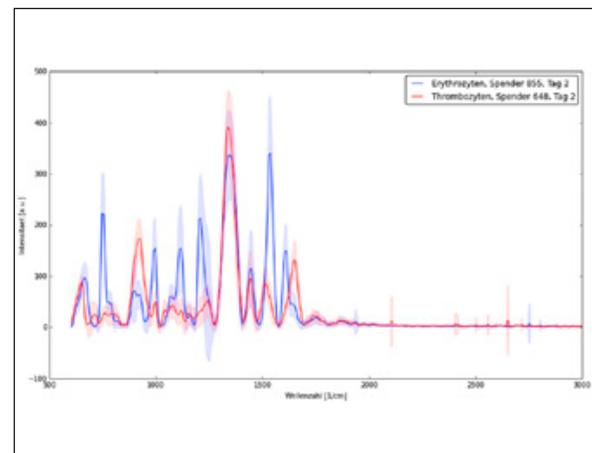


**Abb. 1** Ergebnisse von Raman-Spektroskopie und anschließender Hauptkomponentenanalyse (PCA) von *Pseudomonas*- und *Staphylococcus*-Proben. Der Score Plot (PC-1/PC-3) zeigt Raman-Spektren von verschiedenen *Pseudomonas* ●●● - und *Staphylococcus* ●●●-Stämmen. Jeder Punkt in diesem Score Plot stellt eine gemessene Zelle dar.

## Herausforderung 1– Identifizierung von Bakterienstämmen

Das zunehmende Auftreten von gegen Antibiotika resistenten Bakterien stellt in modernen Krankenhäusern eine ernste Gefahr dar. Um die Sicherheit der Patienten zu gewährleisten, müssen eine regelmäßige Prüfung auf verbleibende Mikroorganismen und deren Charakterisierung erfolgen. Aktuelle Verfahren wie die Massenspektrometrie analysieren ganze Bakterienkolonien. Damit kann allerdings nur ein Gesamtbild der Bakterienkultur gezeigt werden, während Teilpopulationen ggf. unterrepräsentiert sind oder sogar in den Ergebnissen verborgen bleiben.

Um das Potentials des BioRam<sup>®</sup>-Systems in diesem Bereich zu demonstrieren, analysierten wir drei verschiedene Stämme von *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus aureus*, die zuvor mit Ethanol fixiert wurden. Während der Messung wurden die einzelnen Zellen durch optisches Trapping auf ihrer Position gehalten, was die Erfassung von aussagekräftigen Raman-Spektren ermöglichte. Die anschließende Analyse der Raman-Spektren mittels einer Hauptkomponentenanalyse (PCA) (ein Standardverfahren zum Reduzieren der Dimensionalität in hochdimensionalen Datensätzen) ermöglichte eine Unterscheidung der Bakterienarten und -stämme. *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus aureus* Proben unterschieden sich in ihren spezifischen Raman-Spektren (siehe Abb. 1). Detailliertere Analysen in denen jeweils nur die Daten der *Pseudomonas aeruginosa* bzw. *Staphylococcus aureus* Proben berücksichtigt wurden ermöglichten dabei eine noch bessere Differenzierung der einzelnen Stämme (Daten nicht dargestellt).



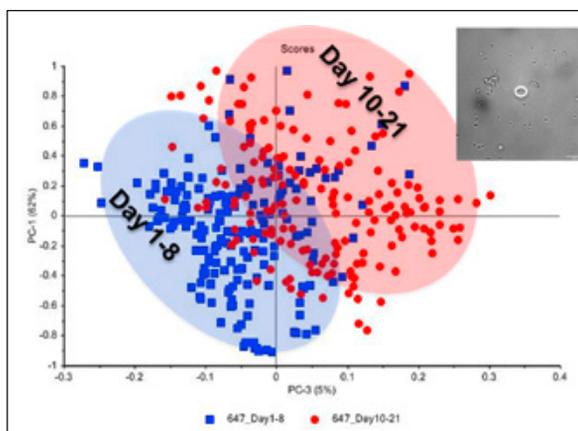
**Abb. 2** Raman-Spektren von Erythrozyten (blau) und Thrombozyten (rot): Durchschnittsspektren mit Standardabweichungen von Erythrozyten ● und Thrombozyten ● unterscheiden sich deutlich. Die stärksten Unterschiede sind vor allem mit der Häm-Gruppe verknüpft.

Neben der Messung von mit Ethanol fixierten Bakterien kann eine Raman-Spektroskopie auch an lebenden Mikroorganismen durchgeführt werden. Beispielsweise an Kolonien die direkt von einer Agarplatte entnommen wurden, die der Raumluft ausgesetzt war [6].

Einer der großen Vorteile der Raman-Spektroskopie gegenüber anderen Verfahren wie Plaque-Assays, PCR oder Massenspektroskopie ist die Einzelzellauflösung. Dadurch ist die Raman Spektroskopie in der Lage auch einzelne, seltene Zellen innerhalb großer Bakterienpopulationen zu detektieren.

## Herausforderung 2 – Qualitätskontrolle von Blutprodukten

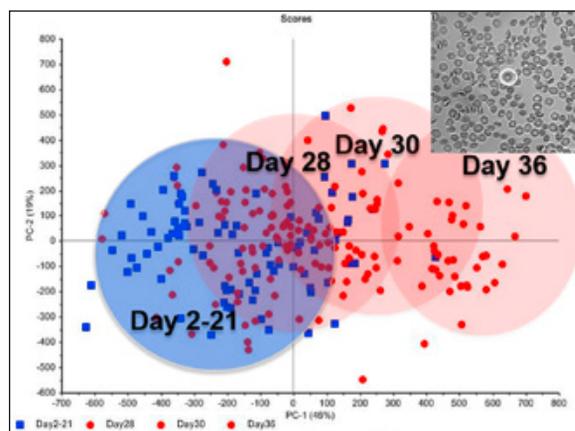
Nach wie vor ist die Gewährleistung der Qualität von allen Blutprodukten schwer zu bewerkstelligen. Nur etwa 1 % der Blutbeutel wird tatsächlich auf Qualität und Reinheit getestet. Diese Tests werden darüber hinaus während der Produktion der Blutprodukte durchgeführt und die getesteten Beutel müssen anschließend entsorgt werden. Dies bedeutet, dass bisher keine Kontrolle von Blutprodukten unmittelbar vor der Transfusion erfolgt. Die Kombination von Raman-Spektroskopie und optischer Pinzette liefert einen nicht invasiven, schnellen und einfachen Ansatz zum Gewährleisten der Qualität von Blutprodukten direkt vor dem Gebrauch. Dies verbessert zum einen die Patientensicherheit und spart andererseits Geld, da Blutprodukte einzeln getestet werden können und nicht aufgrund von empirisch festgelegten Daten entsorgt werden müssen.



**Abb. 3a** Score Plot von Thrombozyten-Messungen: Spektren von Zellen, die zwischen Tag 1 und 8 erhoben wurden, unterscheiden sich von Spektren, die zwischen Tag 10 und 21 erhoben wurden, was auf Änderungen in den Thrombozyten nach Tag 8 hinweist. Oben rechts: repräsentative lichtmikroskopische Aufnahme. Der Kreis zeigt die Position des analysierten Bereiches an.

In einem ersten Versuch erhoben wir Raman-Spektren von lebenden Erythrozyten und Thrombozyten mit dem BioRam<sup>®</sup>-System. Genau wie Bakterien wurden die Blutzellen aufgrund des Trapping-Effekts im Laserfokus gehalten, was eine Erfassung aussagekräftiger Spektral-daten ermöglichte. Die Spektren der verschiedenen Zelltypen unterschieden sich erheblich, vor allem aufgrund des Vorhandenseins der hochgradig Raman-aktiven Häm-Gruppe in Erythrozyten, was eine sehr gute Unterscheidung der Zellen ermöglichte (siehe Abb. 2).

In einer weiteren Versuchsreihe verwendeten wir die Raman-Spektroskopie zur Untersuchung des Alterungsprozesses in Thrombozyten- und Erythrozyten-Konzentraten (Abb. 3). Die Analyse von Thrombozyten-Konzentraten von drei verschiedenen Spendern bis 21 Tage nach der Zubereitung zeigte, dass sich die Plättchen am Tag 8 in ihren Raman-Spektren zu unterscheiden begannen, wobei die stärksten Änderungen in einem Wellenzahlbereich von  $1.296\text{cm}^{-1} - 1.333\text{cm}^{-1}$  zu beobachten waren (siehe Abb. 3a). Unterschiede in diesem Bereich sind nach heutigem Erkenntnisstand mit apoptotischem Zelltod verknüpft [7, 8]. Die Analyse von Konzentraten roter Blutzellen über einen Zeitraum von 36 Tagen nach der Spende ergab vergleichbare Ergebnisse. Hier war der Beginn des Zellsterbens jedoch spenderabhängig und setzte zu verschiedenen Zeitpunkten ein (siehe Abb. 3b). Die erzielten Ergebnisse zeigen, dass die Raman-Spektroskopie in Kombination mit einer optischen Pinzette ein wertvolles Werkzeug darstellt mit dem die Qualität von Blutprodukten schnell, einfach und zerstörungsfrei direkt vor dem Gebrauch sichergestellt werden kann. Damit kann diese Technologie zu einer erhöhten Sicherheit in der Transfusionsmedizin beitragen.



**Abb. 3b** Score Plot von Erythrozyten-Messungen: Die PC-1-Scores korrelieren mit Zellzuständen von Erythrozyten. Bis zum Tag 21 sind alle Spender identisch. Danach zeigen sich spenderabhängige Änderungen in den Spektren. Die Veränderung der Spektren tritt zu verschiedenen Zeitpunkten ein: jeweils an Tag 28, Tag 30 und Tag 36. Oben rechts: repräsentative lichtmikroskopische Aufnahme. Der Kreis zeigt die Position des analysierten Bereiches an.



### **Florian Zunhammer**

erwarb seinen Bachelor-Abschluss in molekularer Biotechnologie und seinen Master-Abschluss in industrieller Biotechnologie. Seit 2015 arbeitet er bei der CellTool GmbH als Anwendungsspezialist. Er ist mit der Verfeinerung und Verbesserung des BioRam<sup>®</sup>-Systems sowie mit der Entwicklung von robusten und zuverlässigen statistischen Datenanalyseverfahren für Qualitätskontrollanwendungen befasst.



### **Heidi Kremling**

studierte Biologie an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg und ist Biologin und Expertin für 2D- und 3D-Zellkultur, Tumorbilogie und Zellanalyse. 2014 schloss sie ihre Promotion am Klinikum Großhadern in München ab. Seit Februar 2015 leitet Dr. Kremling das Demonstrations- und Servicelabor von CellTool und ist für die wissenschaftlichen Forschungsk Kooperationen zuständig.



### **Tanja Buchacher**

erwarb ihren Master-Abschluss in Biotechnologie an der Universität für Bodenkultur Wien, Österreich. Sie promovierte an der gleichen Universität in Biochemie. Während dieser Zeit arbeitete sie eng mit Immunologen der Medizinischen Universität Wien und Forschern des österreichischen Instituts für Technologie zusammen. Derzeit führt Sie Ihre Forschungsarbeit als Postdoc fort.



### **Torsten Tonn**

ist Professor für Transfusionsmedizin an der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus, Technische Universität Dresden. Er ist ebenfalls Geschäftsführer des DRK-Blutspendedienstes Nord-Ost. Vor dieser Stellung leitete er den Bereich für Zell- und Gentherapie des Instituts für Transfusionsmedizin in Frankfurt am Main. In seinem Fokus steht die Verbesserung der Qualität und Sicherheit von zellbasierten Produkten und die Umsetzung von modernen Zelltherapien in den Klinikalltag.



### **Roland Werk**

hat einen Abschluss in Mikrobiologie und Medizin. Er ist klinischer Mikrobiologe am BABENDE Institut und dort mit einem systematischen biologischen Ansatz für Darmbakterien befasst.



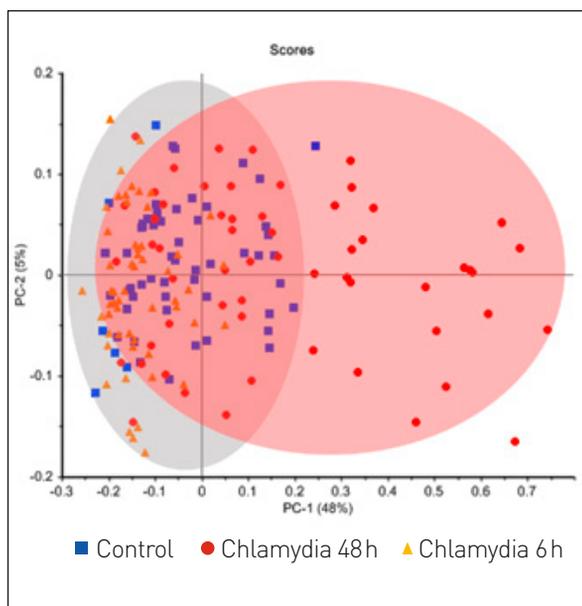
### **Karin Schütze**

studierte Biologie und Sport in Heidelberg und promovierte am Institut für angewandte physikalische Chemie der Universität Heidelberg. Als PostDoc entwickelte sie an der University of California, Berkeley, USA, ihre erste optische Pinzette. 1993 gründete sie mit ihrem Mann Raimund Schütze das Unternehmen PALM, das 2004 erfolgreich an Carl Zeiss verkauft wurde. 2008 gründete sie mit ihrem Mann die CellTool GmbH, die sich auf die Entwicklung von Raman-Systemen für biomedizinische Anwendungen fokussiert. 2006 erhielt sie den Berthold Leibinger Innovationspreis und wurde für den Deutschen Zukunftspreis des deutschen Bundespräsidenten nominiert.

## Herausforderung 3 – Erkennen von Infektionen

Die Kombination von Raman-Spektroskopie und Laser Trapping kann auch als schnelles Diagnosewerkzeug zum Erkennen von infizierten Zellen verwendet werden. Der obligate intrazelluläre Krankheitserreger *Chlamydia pneumoniae*, der für Atemwegserkrankungen und eine ganze Reihe von chronischen Krankheiten verantwortlich ist, nutzt zirkulierende Monozyten als Wirtszellen um seine eigene Vermehrung und Verbreitung zu fördern [9].

Um zu zeigen, dass die BioRam<sup>®</sup> Technologie auch zur Detektion von Infektionen geeignet ist, führten wir einen Versuch durch, bei dem Monozyten mit *C. pneumoniae* infiziert und Raman-Spektren 6 h und 48 h nach der Infektion aufgezeichnet wurden. Der in Abbildung 4 dargestellte PCA Score-Plot zeigt eine klare Unterscheidung zwischen gesunden und infizierten Monozyten nach 48 h. Infizierte Monozyten unterschieden sich nach 6 h nicht von gesunden Monozyten, während 48 h nach der Infektion etwa 50 % der infizierten Zellen Unterschiede in ihren Raman-Spektren aufwiesen, (siehe Abb. 4). Die größten Unterschiede zwischen gesunden und infizierten Monozyten konnten in den Bereichen  $1.645 - 1.660 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1.430 - 1.451 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1.327 - 1.356 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1.290 - 1.306 \text{ cm}^{-1}$  und  $888 - 934 \text{ cm}^{-1}$  des Raman-Spektrums nachgewiesen werden, welche auf Änderungen im Bereich der Lipide, Fettsäuren und Nukleinsäuren hinweisen [7]. Die



**Abb. 4** PCA-Score-Plot von mit *C. pneumoniae* infizierten Monozyten. Gezeigt sind Monozyten 6 h ▲ und 48 h ● sowie Kontroll-Monozyten ■. Etwa die Hälfte der infizierten Monozyten zeigen eine Veränderung im Raman Spektrum (rechte Population).

Ergebnisse der Raman-Spektroskopie konnten mit Oligonucleotid-DNA-Mikroarray [10], quantitativer Echtzeit-PCR und Immunfluoreszenz verifiziert werden. Eine Raman-Analyse kombiniert mit einer optischen Pinzette könnte daher den momentan verwendeten Blutkulturen für die Erkennung und Charakterisierung von Zellinfektionen überlegen sein, da sie Krankheitserreger sehr schnell und hochsensitiv detektieren kann.

## Schlussfolgerung

Die konfokale Raman-Trapping-Mikroskopie, eine Kombination aus Raman-Spektroskopie und optischer Pinzette, ist ein hochempfindliches Verfahren zur Detektion kleiner Unterschiede zwischen Zellpopulationen mit einer großen Bandbreite von Anwendungen. In den hier beschriebenen Experimenten konnten wir nachweisen, dass die Raman-Spektroskopie als universaler „photonischer Marker“ für die schnelle und effiziente Identifizierung von Krankheitserregern, die Messung der „Zellfitness“ (das heißt Funktionalität) und die frühzeitige Erkennung von Infektionen einsetzbar ist. Daneben konnten wir zeigen, dass die zerstörungsfreie Datenerfassung mittels der BioRam<sup>®</sup> Technologie auch dazu beitragen kann die Identifizierung von Stammzellen zu erleichtern, die Qualität von zellbasierten Therapien zu gewährleisten oder die Krebsdiagnose zu unterstützen [6].

■ [f.zunhammer@celltool.de](mailto:f.zunhammer@celltool.de)  
■ [k.schuetze@celltool.de](mailto:k.schuetze@celltool.de)

### Literatur

- [1] Greulich, K. O., Schütze, K. & Zunhammer, F. (2015) A Review. Rep. Prog. Phys. in Press
- [2] Ashkin, A. (1970) Phys. Rev. Lett. 24, 156–159
- [3] Dochow, S. et al. (2011) Lab Chip 11, 1484–1490
- [4] Ashkin, A & Dziedzic, J. M. (1987) Science 235, 1517–1520
- [5] Schütze, K. u. Iement-Sengewald, A. (1994) Nature 368, 667–669
- [6] Gangnus, R. et al. (2014) Lab&More, 22–27
- [7] Talari, A. C. S. et al. (2014) Applied Spectroscopy Reviews, 46–111 doi:10.1080/05704928.2014.9239
- [8] Verrier, S. et al (2004) Biopolymers 74, 157–162
- [9] Gaydos, C. A. et al. (1996) Infect. Immun. 64, 1614–1620
- [10] Buchacher, T. et al. (2014) BMC Immunol. 15, 1–11



Den Beitrag finden Sie  
auch online im q&more-Portal  
■ [www.bit.ly/qmore1601-03](http://www.bit.ly/qmore1601-03)