

Fachorgan für Wirtschaft und Wissenschaft
Amts- und Mitteilungsblatt der
Physikalisch-Technischen Bundesanstalt
Braunschweig und Berlin

118. Jahrgang, Heft 4, Dezember 2008

Inhalt

Themenschwerpunkt	Metrologie für die molekulare und zelluläre Medizin	
	<ul style="list-style-type: none">• <i>Rainer Macdonald</i>: Metrologie für die molekulare und zelluläre Medizin: Notwendigkeit und Herausforderung 233• <i>Jörg Neukammer, Manuela John, Andreas Kummrow, Stephan Reitz, Sandra Schädel, Karin Schulze, Klaus Witt</i>: Reference procedures for the determination of cell concentration in body fluids 236• <i>Marcin Frankowski, Andreas Kummrow, Jörg Neukammer, Andrej Tuchscheerer, Martin Schmidt</i>: Development of microfluidic structures for flow cytometric blood cell differentiation 243• <i>Sandra Schädel, Andreas Kummrow, Jörg Neukammer</i>: Erste Untersuchungen zur Kinetik von Antigen-Antikörper-Reaktionen bei der immunologischen Färbung von Blutzellen 248• <i>Jan Voigt, Bernd Ebert, Angelika Hoffmann, Rainer Macdonald</i>: Validierung eines "Fluorescent Enzyme Linked Immunosorbent Assay" (ELISA) 255• <i>Steffen Rüttinger, Benedikt Krämer, Martin Roos</i>: Mikroskopisches Messverfahren für nanometrische Abstandsmessungen an einzelnen Makromolekülen unter nativen Bedingungen 261• <i>Bernd Ebert, Kai Licha</i>: Fluoreszenzgestützte molekulare Bildgebung <i>in vivo</i> 265• <i>Dietmar Eberbeck, Uwe Steinhoff, Lutz Trahms</i>: Quantifizierung biomolekularer Bindungen mit magnetischen Nanopartikeln als Sonden 271• <i>Wolfgang Kilian, Frank Seifert, Bernd Ittermann</i>: Xenon als spezifische Sonde für die Magnetresonanztomographie 274	
Recht und Technik	13. Internationale Konferenz der OIML in Sydney, 27.–31. Oktober 08	278
Amtliche Bekanntmachungen	(eigenes Inhaltsverzeichnis)	282

Zum Titelbild: Zur Zelldifferenzierung und Zählung von Blutzellen werden Durchflusszytometer verwendet, in denen die Zellen in einem hydrodynamisch fokussierten Probenstrom einzeln nacheinander durch Streulichtmessungen und Fluoreszenzmessungen identifiziert werden (siehe PTB-Mitteilungen 118 (2008), Heft 4, Seite 236). Die Abbildung zeigt die mit Hilfe einer intensivierten CCD Kamera (ICCD) aufgenommenen Streulichtverteilungen einzelner, aufgekugelter roter Blutzellen (Erythrozyten) und eines Blutplättchens. Aus diesen Streulichtverteilungen, die vertikale Streifen aufweisen, lassen sich mit Hilfe der Mie-Theorie die Volumina einzelner Erythrozyten (typisch 90 fL) mit hoher Präzision ($\pm 0,2$ fL) bestimmen.

Impressum

Die **PTB-Mitteilungen** sind metrologisches Fachjournal und amtliches Mitteilungsblatt der Physikalisch-Technischen Bundesanstalt, Braunschweig und Berlin. Als Fachjournal veröffentlichen die PTB-Mitteilungen wissenschaftliche Fachaufsätze zu metrologischen Themen aus den Arbeitsgebieten der PTB. Als amtliches Mitteilungsblatt steht die Zeitschrift in einer langen Tradition, die bis zu den Anfängen der Physikalisch-Technischen Reichsanstalt (gegründet 1887) zurückreicht. Die PTB-Mitteilungen veröffentlichen in ihrer Rubrik „**Amtliche Bekanntmachungen**“ unter anderem die **aktuellen Geräte-Prüfungen** und -Zulassungen aus den Gebieten des Eich-, Prüfstellen- und Gesundheitswesens, des Strahlenschutzes und der Sicherheitstechnik.

Verlag

Wirtschaftsverlag NW
Verlag für neue Wissenschaft GmbH
Bürgermeister-Smidt-Str. 74–76,
27568 Bremerhaven
Postfach 10 11 10, 27511 Bremerhaven
Internet: www.nw-verlag.de
E-Mail: info@nw-verlag.de

Herausgeber

Physikalisch-Technische Bundesanstalt (PTB),
Braunschweig und Berlin
Postanschrift:
Postfach 33 45, 38023 Braunschweig
Lieferanschrift:
Bundesallee 100, 38116 Braunschweig

Redaktion/Layout

Presse- und Öffentlichkeitsarbeit, PTB
Dr. Dr. Jens Simon (verantwortlich)
Gisela Link
Telefon: (05 31) 592-82 02
Telefax: (05 31) 592-30 08
E-Mail: gisela.link@ptb.de

Leser- und Abonnement-Service

Marina Kornahrens
Telefon: (04 71) 9 45 44-61
Telefax: (04 71) 9 45 44-88
E-Mail: vertrieb@nw-verlag.de

Anzeigenservice

Karin Drewes
Telefon: (04 71) 9 45 44-21
Telefax: (04 71) 9 45 44-77
E-Mail: info@nw-verlag.de

Erscheinungsweise und Bezugspreise

Die PTB-Mitteilungen erscheinen viermal jährlich. Das Jahresabonnement kostet 55 Euro, das Einzelheft 16 Euro, jeweils zzgl. Versandkosten. Bezug über den Buchhandel oder den Verlag. Abbestellungen müssen spätestens drei Monate vor Ende eines Kalenderjahres schriftlich beim Verlag erfolgen.

© Wirtschaftsverlag NW, Verlag für neue Wissenschaft GmbH, Bremerhaven, 2008

Alle Rechte vorbehalten. Kein Teil dieser Zeitschrift darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages vervielfältigt oder verbreitet werden. Unter dieses Verbot fällt insbesondere die gewerbliche Vervielfältigung per Kopie, die Aufnahme in elektronische Datenbanken und die Vervielfältigung auf CD-ROM und in allen anderen elektronischen Datenträgern.

Metrologie für die molekulare und zelluläre Medizin: Notwendigkeit und Herausforderung

Rainer Macdonald¹

Bedeutende Fortschritte im Verständnis der molekularen sowie der zellbiologischen Ursachen von Krankheiten führen in zunehmendem Maße zu neuen, vielversprechenden medizinischen Diagnoseverfahren und Therapieansätzen, die unter den Schlagworten „molekulare“ und „zelluläre“ Medizin subsummiert werden können [1, 2]. Die Vorteile, speziell der molekularmedizinischen Diagnostik, beruhen vor allem auf einer hohen Nachweisempfindlichkeit und Spezifität. Bereits heute ist absehbar, dass die bedeutenden Schlüsselinnovationen der nächsten zehn Jahre auf diesem Gebiet der Medizin zu erwarten sind.

Zuverlässige Messverfahren und -methoden sind dabei wesentliche Voraussetzungen für weitere Fortschritte in der grundlegenden Erforschung bio-medizinischer Verfahren auf der Ebene von Zellen und Molekülen sowie für deren nachhaltige wissenschaftlich-technologische Umsetzung und Nutzung. **Die Notwendigkeit** hierfür wurde u.a. von Elias Zerhouni, Direktor der US-amerikanischen National Institutes of Health klar formuliert [3]: *„Future progress in medicine will require quantitative knowledge about the many interconnected networks of molecules that comprise cells and tissues, along with improved insights into how these networks are regulated and interact with each other.“* **Letztendlich sind dazu** Messungen auf der Ebene von einzelnen Genen, Proteinen und Zellen bis hin zu Zellverbänden und Gewebe erforderlich.

Die Komplexität derartiger Bio-Messungen erfordert einerseits die Entwicklung und den Einsatz geeigneter Messtechniken sowie von „state-of-the-art“ Instrumentierung, als andererseits auch anspruchsvolle Datenanalyseverfahren, um unter den schwierigen Bedingungen biologischer Systeme aussagefähige Resultate zu erhalten. Nicht zuletzt müssen die Verfahren hinsichtlich Genauigkeit, Zuverlässigkeit und Angemessenheit validiert werden. Oftmals be-

steht die metrologische Herausforderung jedoch zunächst ganz grundsätzlich darin, herauszufinden, welche medizinisch relevanten molekularen- oder zellbiologischen Merkmale quantitativ bestimmt werden können oder müssen und wie geeignete Messgrößen zu definieren sind.

Ogleich Messungen in der molekularen Medizin und Zellbiologie – wie überhaupt in den modernen Biowissenschaften – eine immer wichtigere Rolle spielen, sind die Konzepte und Werkzeuge der Metrologie in diesem Bereich wenig bekannt oder verbreitet. Dies liegt einerseits daran, dass das klassische Konzept der Metrologie, d.h. die Definition international akzeptierter Maßeinheiten, die wissenschaftliche Realisierung und Bereitstellung der Einheiten und die Etablierung von lückenlosen Rückführungsketten mit dokumentierten Messunsicherheiten traditionell eng mit der Physik und den technischen Ingenieurwissenschaften sowie den in diesen Fachgebieten verwendeten Messgrößen verbunden ist, sich dieses Konzept jedoch nicht ohne weiteres auf komplexe biologische Systeme übertragen lässt. Andererseits ist aber auch zu berücksichtigen, dass der Begriff „Messung“ in der Biologie und Bio-Medizin in der Regel deutlich weiter als in der klassischen Metrologie gefasst wird. Während sich der Begriff „Messung“ im metrologischen Sinn ausschließlich auf die Schätzung von physikalischen Merkmalen wie z. B. Länge, Gewicht, Ladung etc. pp. relativ zu einer Einheit bezieht, liegt den so genannten „Bio-Messungen“ oftmals eine wesentlich umfassendere Definition aus der Mathematik und Statistik zu Grunde, die z. B. formuliert wird als [4] *“Process of associating numbers, in an empirical and objective way, to characteristics of objects and events of the real world in a way so as to describe them“*. Diese sehr allgemeine Definition beinhaltet sowohl die Bestimmung und Beschreibung quantitativer – d.h. klassisch metrologischer – als auch qualitativer Merkmale. Die Zuordnung

¹ Prof. Dr. Rainer Macdonald, Leiter des Fachbereichs „Biomedizinische Optik“, E-Mail: rainer.macdonald@ptb.de

von Zahlen zu metrischen oder topologischen Skalen ist dabei nur eine Möglichkeit unter anderen. Die unterschiedlichen Auffassungen des Begriffs „Messung“ lassen sich sehr schön an einer Zusammenstellung der Merkmale von Bio-Messungen ablesen und diskutieren, die von der englischen BioIndustry Association (BIA) im Rahmen des Forschungsprogramms Measurement for Biotechnology (MfB) erarbeitet wurde und in Tabelle 1 wiedergegeben ist.

Einige der in Tabelle 1 angeführten Merkmale stellen Messgrößen im klassischen Sinne dar, z. B. die Länge einer Nukleinsäure-Sequenz, die Größe oder die Masse eines Proteins, die Stoffmenge einer Nukleinsäure oder eines Pro-

teins sowie die Anzahl von Zellen. Somit sollten sich für diese oder ähnliche Bio-Messgrößen auch die bewährten Konzepte und Werkzeuge der Metrologie prinzipiell anwenden lassen. Praktisch wird dieses allerdings oftmals dadurch erschwert, dass in vielen Fällen wegen der sehr kleinen Abmessungen oder Volumina mit hoher Präzision und unter schwierigen Bedingungen gemessen werden muss. In der Regel liegen die gewünschten Bio-Moleküle oder Zellen in einer schlecht reproduzierbaren Matrix in Gegenwart vieler anderer Bio-Moleküle oder anderer Substanzen vor, die einerseits nicht durch Aufreinigung oder ähnliches entfernt werden dürfen, da sie für wichtige Funktionen oder Eigenschaften der Zielmoleküle wichtig sind, die andererseits aber auch wesentliche Einflussgrößen darstellen und zu erhebliche systematischen Messabweichungen führen können.

Daneben sind Messungen von Merkmalen höherer Komplexität angeführt, wie z. B. die Identität oder die Funktionalität von Proteinen und Zellen sowie die Entwicklungsfähigkeit von oder die Wechselbeziehung zwischen Zellen. Hierbei handelt es sich auf den ersten Blick um qualitative und nicht um quantitative Merkmale, die nur im Sinne einer verallgemeinerten Definition „gemessen“ und z. B. auf nominalen oder ordinalen Skalen dargestellt werden können. Die derzeit bekannten Konzepte und Methoden der Metrologie sind auf diese nicht-quantitativen Merkmale nicht unmittelbar anwendbar und es ist fraglich, ob sie hierfür entsprechend verallgemeinert oder angepasst werden können. Andererseits lassen sich einige dieser qualitativen Merkmale möglicherweise doch quantitativ ausdrücken und durch geeignete Messgrößen darstellen. Die Identität eines Proteins lässt sich z. B. über seine Aminosäuresequenz oder die Folge von Peptidfragmenten festlegen und messen. Die Funktion eines Proteins kann über die Bindungsstärke zu einem Rezeptormolekül und damit prinzipiell über eine Messung der Bindungskraft oder der Bindungskinetik quantifiziert werden. Die Entwicklungsfähigkeit von Zellen lässt sich quantitativ durch die Zellteilungsrate oder die Antwortzeit auf eine plötzliche Veränderung in der Umgebung ausdrücken. Die Funktionalität von Zellen lässt sich durch die Gen-Expressions- oder Stoffwechselrate definieren.

Anhand dieser hier nur kurz umrissenen Beispiele lassen sich folgende Herausforderungen und Fragestellungen für die Metrologie auf diesem Gebiet ableiten:

- Welche medizinisch relevanten molekularen und zellulären Merkmale können und sollten quantitativ gemessen werden?
- Wie sind dafür geeignete Messgrößen zu definieren und mit welchen Messverfahren werden sie gemessen?

Tabelle 1:
Messungen in den Bio-Wissenschaften (nach [5])

Gegenstand der Messung	Merkmal („was gemessen wird“)
Nukleinsäure	Sequenz der Basen
	Länge der Basen-Sequenz
	Stoffmenge
Protein	Identität <i>Aminosäure- / Peptidfragment-Sequenz</i>
	Stoffmenge
	Größe <i>Anzahl der Peptidfragmente, Masse</i>
	Funktionalität <i>Rezeptorbindung, Signaltransduktion</i>
	Aktivität <i>Enzymkatalyse, Antikörperaffinität</i>
	Struktur <i>primär bis quaternär</i>
Zellen / Gewebe	Identität <i>Zelltypisierung, -profilierung, Wachstumseigenschaften</i>
	Zellkonzentration <i>Zellzählung</i>
	Zellvolumen
	Entwicklungsfähigkeit <i>Wachstum, Response</i>
	Funktionalität <i>Gen-Expression, Metabolismus</i>
	Wechselbeziehung <i>Adhäsion, Zellerkennung, Toxizität</i>

- Welche Genauigkeit ist dabei erforderlich und wie kann eine Rückführungskette zur Gewährleistung von Vergleichbarkeit und Zuverlässigkeit realisiert werden?

Zusammen mit klinischen Partnern, mit Biologen und Kooperationspartnern aus der Wirtschaft stellt sich die PTB den skizzierten Herausforderungen und nähert sich durch exploratorische Forschungs- und Entwicklungsarbeiten diesen Problemen, um erste Antworten auf derartige Fragestellungen zu finden. Eine Auswahl dieser Arbeiten und der bisher erzielten Ergebnisse wird in diesem Heft vorgestellt.

Im Beitrag von J. Neukammer und Mitarbeitern werden der aktuelle Stand sowie zukünftige Entwicklungstendenzen für die von der PTB bereitgestellten durchflusszytometrischen Messverfahren zur Bestimmung von Referenzmesswerten für Ringversuche im Rahmen der externen Qualitätssicherung medizinischer Laboratorien skizziert. Der Beitrag von M. Frankowski et al. beschreibt Forschungsarbeiten zur Weiterentwicklung durchflusszytometrischer Messverfahren als mikrofluidische Strukturen. Der Artikel von S. Schädel beleuchtet die Wichtigkeit immunologischer Färbemethoden für die Diagnostik von Zellen und stellt Untersuchungsergebnisse zur Kinetik von Antigen-Antikörper-Reaktionen in diesem Kontext vor. Der Bericht von J. Voigt et al. stellt erste Ergebnisse zur Validierung eines Fluoreszenz-gestützten Immunoassays vor, die im Rahmen einer internationalen Pilotstudie zur Untersuchung der Vergleichbarkeit derartiger, häufig in der biomedizinischen Diagnostik eingesetzter Assays durchgeführt wurden. Von D. Eberbeck et al. werden Ergebnisse von Arbeiten mit einem anderen Messverfahren für Immunoassays vorgestellt, für welches magnetische Nanopartikel und SQUID-Sensoren (Superconducting Quantum Interference Device) vorteilhaft eingesetzt werden. Im Beitrag von S. Rüttinger und V. Buschmann wird ein quantitatives mikroskopisches Verfahren zur Messung nanometrischer Abstände an einzelnen Makromolekülen unter nativen Bedingungen vorgestellt und dessen Genauigkeit untersucht. Die Aufklärung molekularer biologischer Prozesse mit Hilfe geeigneter Sonden sowie deren Messung und Visualisierung in vivo für diagnostische Zwecke wird in einem Beitrag über Fluoreszenz-gestützte molekulare Bildgebung von B. Ebert und K. Licha dargelegt. W. Kilian et al. untersuchen ebenfalls ein in vivo Messverfahren der bildgebenden Diagnostik und setzen hierfür hyperpolarisiertes Xenon als spezifische Sonde in der Magnetresonanztomographie ein.

Ogleich die im vorliegenden Themenheft vorgestellten Arbeiten nicht annähernd einen umfassenden Überblick über alle relevanten Methoden und Messverfahren im Bereich der mole-

kularen und zellulären Medizin geben können, verdeutlichen sie dennoch in unterschiedlicher Weise die oben skizzierten Herausforderungen und Aufgaben für die Metrologie, die sich bereits heute abzeichnen. Fortschritte auf diesem Gebiet sind eine wesentliche Voraussetzung, um insbesondere die molekular-medizinische Diagnostik weiter voranzubringen und damit die medizinische Diagnostik im Allgemeinen stärker als bisher auf eine wissenschaftliche Basis zu stellen und sie dadurch zuverlässiger und effizienter zu gestalten.

Literatur

- [1] Kulozik, A.E.; Hentze, M.W.; Hagemeyer, C.; Bartram, C.R.: Molekulare Medizin. Berlin, New York: Walter de Gruyter, (2000)
- [2] Ganten, D. "Grundlagen der molekularen Medizin", Berlin, Heidelberg, New York: Springer, (2003)
- [3] Zerhouni, E.: The NIH Roadmap. *Science* **302**, (2003), pp 63–72
- [4] Finkelstein, L.: Theory and Philosophy of Measurement. In: Handbook of Measurement Science, Sydenham, P. (Ed.), Chichester, New York: J. Wiley, (1993)
- [5] BIA: Better Measurement for Biotechnology. London: BioIndustry Association, (2001) www.bioindustry.org

Reference Procedures for the Determination of Cell Concentrations in Body Fluids

Jörg Neukammer¹, Manuela John², Andreas Kummrow²,
Stephan Reitz², Sandra Schädel², Karin Schulze², Klaus Witt²

1 Introduction

In support of medical diagnosis the concentration of different cells in body fluids has to be known with high accuracy. In the working group "Flow Cytometry and Microscopy" of the Physikalisch-Technische Bundesanstalt (PTB) reference procedures have been developed to determine reference values for the measurands of the Complete Blood Count (CBC). The reference values for the concentration of erythrocytes, platelets and leukocytes as well as the concentration of haemoglobin and the haematocrit value are provided by the PTB to evaluate round robin tests organised by German medical associations. In Germany, participation of clinical laboratories for external quality control is mandatory and regulated by the Guidelines of the German Medical Association (Richtlinien der Bundesärztekammer, RiLiBÄK) [1]. In addition, the maximal admissible deviation from target values determined by reference laboratories is defined in the RiLiBÄK.

In flow cytometry, blood cells are detected and differentiated by impedance changes [2, 3], light scatter or fluorescence signals when passing the measuring sensor or interaction zone [4]. Depending on the instrumental design, count rates between several 100 Hz up to 10 kHz can be obtained. To derive reference measurement values for the concentration of cells, the procedures developed at the PTB are based on gravimetrically controlled volume measurements [5] in combination with serial dilutions to correct for coincidence loss as well as cell loss, e. g. due to adhesion. The method relies on the measurement of the cell concentration as function of the volume fraction of the (blood) sample in the measurement suspension and extrapolation to zero volume fraction. Studies on coincidence loss and correction by serial dilutions were accomplished by several authors [6 – 9] decades ago utilizing the Coulter principle [2], i. e. resistive pulse detection. This method of coincidence correction is not only suited for impedance cell counters but can also be applied for dead

time correction in optically based instruments [4, 10] where cell differentiation is achieved by light scatter or fluorescence of immunologically stained cells.

It is important to point out that the counting loss due to the dead time not only depends on the instrument but also on the size and the rheological properties of the cells. Hence, calibration of the respective instrument is not sufficient and the determination of reference measurement values requires the preparation of a dilution series for each blood sample. The modus operandi to derive reference values of concentrations of erythrocytes and leukocytes is described in German standards [11d, 11e] and recommended by the International Council for Standardisation in Haematology (ICSH) [12, 13]. The series of German standards concerning the complete blood count also includes reference procedures to determine the haemoglobin concentration in blood [11a], blood collection and sample preparation [11b], characteristic quantities for erythrocytes [11c] and the determination of the packed cell volume by centrifugation [11g]. In addition, a reference procedure to determine platelet concentrations is described [11f], which includes specific immunological staining [14, 15] to identify the target cells.

2 Instrumentation

The concentration of the measurement suspensions used for the dilution series depends on the design of the instrument. The original blood sample has to be diluted by about $2 \cdot 10^{-4}$ to $1 \cdot 10^{-5}$ in impedance counters with a sensitive region of diameter and length of 100 μm . The high dilution factor is required to reduce the probability that more than one particle is within the measuring orifice. In instruments featuring hydrodynamic focussing by a sheath flow, blood cells are forced to pass the interaction region in single file as indicated in Fig. 1a and 1b. The interaction times, which are determined by the velocity of the particles and the length of the sensitive zone, amount to 20 μs for impedance counting of cells (Fig. 1a) and 5 μs in the laser

¹ Dr. Jörg Neukammer,
Head of Working
Group "Flow Cytometry
and Microscopy",
e-mail:
joerg.neukammer@
ptb.de

² Manuela John,
Dr. Andreas Kummrow,
Stephan Reitz,
Dr. Sandra Schädel,
Dr. Karin Schulze,
Klaus Witt,
Working Group
"Flow Cytometry and
Microscopy"

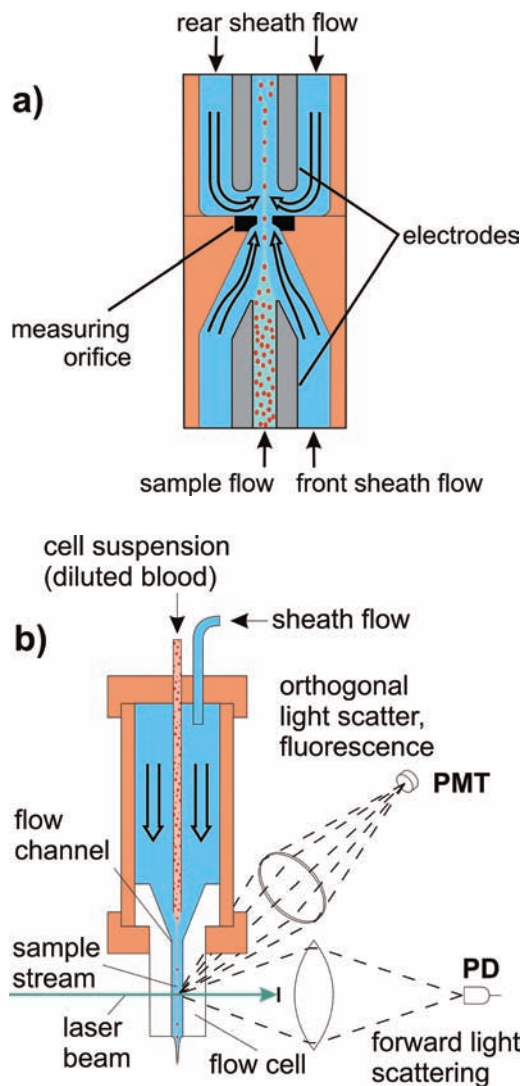


Figure 1:
 a) Schematic of the flow cell for impedance counting of cells
 b) Layout of the flow cell of a laser flow cytometer and sketch of the optical path for the detection of light scattering and fluorescence

flow cytometer (Fig. 1b) for the devices developed at the PTB [5, 16]. The corresponding dilution factors cover the ranges from 1000 to 4000 and 200 to 1000 for the impedance counter and the laser flow cytometer, respectively. In both instruments, a diluted blood sample is fed into the flow cell through a glass capillary. A sheath fluid centres the sample flow containing the particles in the orifice of the impedance counter or in the flow channel of the laser based cytometer.

In Fig. 1a, the blood cells pass the orifice located between two electrodes. A constant current of about 1 mA is feed through the orifice. Since an intact cell acts as isolator, the voltage drop across the sensor is increased when a cell transits the sensor. The signal amplitudes of identically shaped particles are proportionality to the particle volumes [17] and cell populations of different volume can be distinguished. Besides the focussing front sheath flow a second flow is nee-

ded to remove the particles after passing the orifice, since the interaction region extends between both electrodes. Recirculation of cells behind the orifice, which would result in additional smaller signals of larger half width, is inhibited by the rear sheath flow.

In laser flow cytometry, the cells cross one or more focussed laser beams in single file and are detected, identified and counted analysing light scattering in orthogonal as well as in forward direction. Differentiation of cells is possible if their scattering cross-sections, which depend on volume, shape, granularity and (average) refractive index, are different. Improved cell differentiation is achieved by detecting angular distributions of scattered light [18]. Besides light scattering, which is routinely used in laser flow cytometry to distinguish lymphocytes, monocytes and granulocytes, fluorescence detection of immunologically stained cells is applied to distinguish for instance lymphocyte subpopulations (T - lymphocytes, B - lymphocytes and NK cells) when determining the patient's immune status.

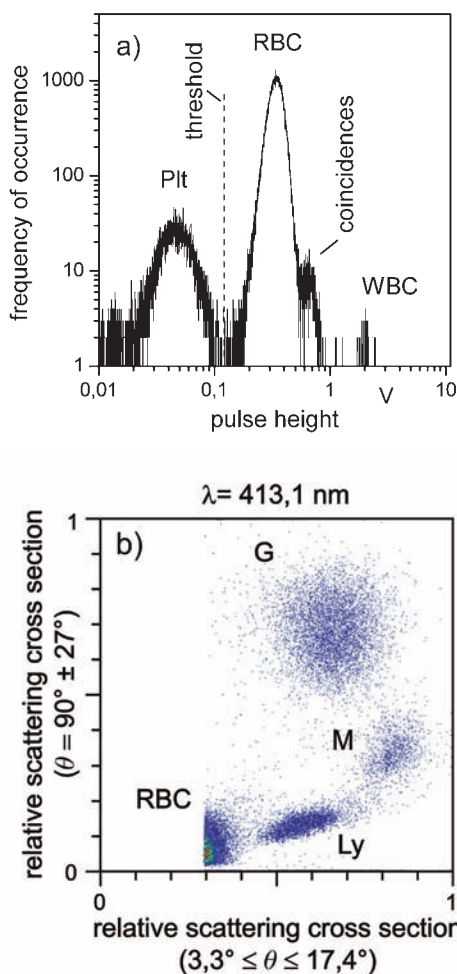
For the preparation of the dilution series the volume of the blood sample and the volume of the isotonic solution are determined gravimetrically. This method results in low uncertainties of measurement $u(\phi)$ for the volume fraction $\phi = V_{\text{blood}} / (V_{\text{blood}} + V_{\text{isoton}})$ of blood in the measuring suspension. When using the impedance instrument for blood cell counting, gravimetrically volume detection by an analytical balance is also carried out to determine the volume of the measurement suspension, which is contained in a beaker. On the other hand, the laser flow cytometer is equipped with a 1 mL syringe, which has been calibrated gravimetrically before to allow precise volume measurement (see [5] for details). In order to derive the volumes from the mass, the densities of blood and isotonic solution are measured by the mechanical oscillator technique [19] with an uncertainty less than 10^{-4} (expansion factor 2). Generally, when following the procedure of gravimetrically controlling all volumes involved, the corresponding contribution to the overall uncertainty of measurement when determining reference measurement values for cell concentrations can be neglected compared to the dominant contributions from biological influencing quantities like adhesion loss or agglomeration.

3 Cell Differentiation

Employing impedance counting, red blood cells and platelets are discernible in control blood as shown in Fig. 2a, were the number of events is plotted versus the pulse height of the impedance signal. Both, the frequency of occurrence and the voltage are given on logarithmic scales in the histogram. The signal amplitudes of platelets are

Figure 2:

- a) Histogram of a diluted blood sample measured with an impedance counter with an orifice of 40 μm diameter and length
- b) Scatterdiagram of a diluted whole blood for the correlated measurement of forward and orthogonal light scatter. Most of the red blood cells (RBC), the concentration of which is three orders of magnitude larger than the leukocyte concentration, are discriminated by the lower level discriminator to enable detection of white blood cell. Clusters of granulocytes (G), monocytes (M) and lymphocytes (Ly) can be discerned.



much smaller compared to the signals of erythrocytes (RBC), reflecting their different (average) volumes of typically 7 fL and 90 fL. The variation in platelet and erythrocyte volumes corresponds to a logarithmic normal distribution, showing up as Gaussian distribution in the histogram due to the logarithmic amplification. For the RBC distribution an additional feature at high signal amplitudes occurs. This shoulder is caused by coincidences, i. e. one or several additional erythrocytes are located simultaneously within the interaction zone. The distribution at large pulse heights is attributed to leukocytes (WBC), the volume of which ranges from 250 fL for lymphocytes to 450 fL for monocytes. The area of the different distributions is correlated with the relative concentrations of the different cell populations. The concentration of erythrocytes in healthy persons is typically $4,5 \cdot 10^6 \mu\text{L}^{-1}$, exceeding the concentrations of platelets and leukocytes by a factor of 20 and 1000, respectively. Because of the large differences in concentrations of red and white blood cells, the model analyse dilution series fails and shall not be applied. Hence the concentration of leukocytes cannot be deduced by simultaneously measuring erythrocytes and leukocytes using impedance counters (see Fig. 2a). To determine reference method values for the concentration of leuko-

cytes, red blood cells have to be destroyed by haemolysis, as is usually done in routine haematology analysis. However, the influence of lysis should be considered when measuring reference values, since the reagents used for lysis might also affect leukocytes.

As an alternative to impedance detection of blood cells, light scattering allows to distinguish blood cells. As an example, in Fig. 2b a typical scatter diagram is depicted when employing a laser wavelength of 413,1 nm. This diagram was obtained by simultaneously measuring light scatter in forward ($3,3^\circ \leq \theta \leq 17,4^\circ$, θ being the polar angle) and orthogonal direction ($\theta = 90^\circ \pm 27^\circ$). Three clusters of cells are clearly visible resulting from the leukocytes subpopulations viz. lymphocytes (Ly), monocytes (M) and granulocytes (G). Using the wavelength of 413,1 nm, red and white blood cells can be differentiated in whole blood samples without the need of prior lysis. In Fig. 2b, most of the signals caused by erythrocytes were electronically eliminated by lower level discrimination. In this way, subpopulations of leukocytes were counted with high statistical significance in diluted whole blood. The method to distinguish red and white blood cells by light scattering is based upon the coincidence of the laser wavelength of 413,1 nm with the absorption maximum of haemoglobin. Because of the strong absorption of haemoglobin the light scattering intensity of red blood cells is reduced compared to other wavelengths, whereas the scattering cross section for white blood cells only slightly changes with wavelength. It follows from the drastic reduction of the light scattering intensity of red blood cells, that the clusters of white blood cells are no longer covered by erythrocyte signals as observed at other wavelengths, e. g. at 488 nm [16]. Hence, much less frequent (approx. 1:1000) white blood cells can be detected and differentiated simultaneously to red blood cells without lysis, i. e. chemical destruction of red blood cells. The application of this method is of particular interest when analysing blood samples of leukaemia patients. In that case white blood cells are exceptionally sensitive against lysing reagents and the target cells are destroyed. In addition, the method is suited to analyse blood samples containing lysis resistant erythrocytes, e. g. blood from newborn infants or from anaemic patients.

4 Analysis of dilution series

The result of a reference measurement for the concentration of red blood cells using impedance counting is shown in Fig. 3. The number of events for the red blood cells was obtained from a histogram by setting a threshold between the distributions of platelets and red blood cells and counting all events above this level as indicated

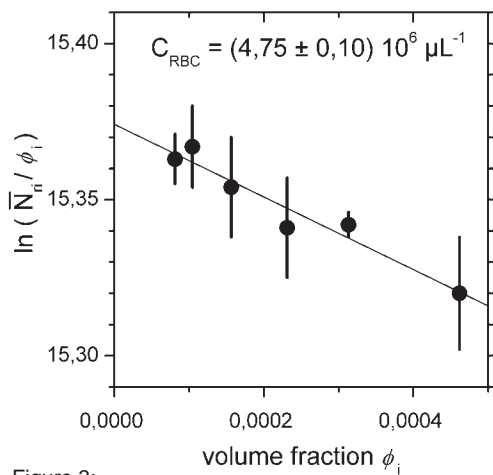


Figure 3: Dilution series of a blood sample to derive the conventional true value of the concentration of erythrocytes by extrapolation to zero volume fraction. Each measuring suspension was prepared independently from the original blood sample.

in Fig. 2. Events caused by leukocytes generally do not affect the final result since their concentration is negligible. A total of six different measuring suspensions with volume fractions ϕ_i ranging from $1 \cdot 10^{-4}$ to $5 \cdot 10^{-4}$ were prepared. In contrast to the usual procedure, where the first preparation is successively further diluted, each dilution was prepared independently from the original blood sample. In this way, the effects of different influencing and disturbing quantities are included. In addition, to allow the reliable determination of uncertainties of measurement independently prepared solutions have to be used. As discussed in detail in the appendix A of DIN 58 932-4 [11e], assuming Poisson statistics for the coincidence loss, the quantity $\ln(\bar{N}_{ri} / \phi_i)$ plotted on the ordinate is related to the volume fraction ϕ_i according to

$$\ln \frac{\bar{N}_{ri}}{\phi_i} = \ln N - \phi_i \cdot N \cdot (\tau/t) \quad (1)$$

The symbol N is the conventional true value for the number of cells in the original sample, \bar{N}_{ri} is the average of repeated measurements of the recorded number of cells of samples i , τ correspond to the pulse resolution time and t to the total measurement time. The pulse resolution time τ includes the interaction time of the cells in the sensor region of the particle counter as well as additional electronic dead times. Since the pulse resolution time is not only determined by the size of the sensor region but also depends on the particles rheological properties, calibration of the instrument for dead time correction is not possible. It follows, that serial dilutions have to be prepared and analysed for each blood sample individually as already mentioned in the introduction. Using equation (1), the value $\ln(N)$ is obtained by plotting $\ln(\bar{N}_{ri} / \phi_i)$ versus ϕ_i as the

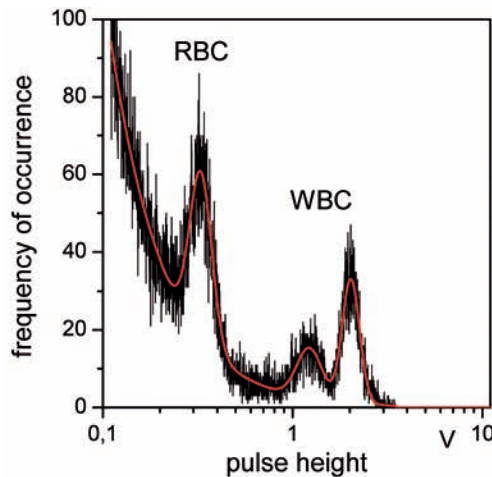
sectioning point of the ordinate with a linear regression line of the experimental data. From the coincidence corrected value N and the volume V the concentration $C = N/V$ is determined.

The uncertainty of measurement for the intercept is elaborated in Appendix B of DIN 58 932-4 and estimated from the uncertainties plotted in Fig. 3 for each dilution as well as from the uncertainties for the volume fraction. The uncertainty of the quantity $\ln(\bar{N}_{ri} / \phi_i)$ is predominantly determined by the variation of the typically 5 to 10 repeated measurements. The error bars assigned to the volume fraction ϕ_i are smaller than the data points and not visible in the graphical representation. A specific feature of the analysis is the correlation of the volume fraction ϕ_i and the quantity $\ln(\bar{N}_{ri} / \phi_i)$ resulting in a contribution of the covariance $u(\phi_i, \ln(\bar{N}_{ri} / \phi_i))$ to the uncertainty of the extrapolated value N . In particular, when using pipettes for the preparation of the measuring suspensions, significant parts of the total uncertainty might be caused by the uncertainties of the volume fractions and the covariance. However, because of the gravimetrically controlled volume determination when preparing the different dilutions for cell counting and the gravimetrically based volume detection of the measurement suspension at the PTB, contributions due to volume measurements are usually negligible. The data analysis is completed by a χ^2 -test considering the related upper and lower limit [20] to prove the consistency of the data and the model used. This approach allows to eliminate data series, were biological influencing and disturbing quantities, e. g. fragile erythrocytes partially destroyed by dilution, inhibit the assignment of reference measurement values to control or fresh blood samples.

5 Future Developments

The reference method applied to determine erythrocyte concentration at high precision might also be suited to analyse cells in other body fluids like cerebrospinal fluid. An example is shown in Fig. 4, where we plotted the histogram of a liquor sample obtained with an impedance counter. Three distinct subpopulations appear in the figure, caused by erythrocytes and leukocytes. Although the sample exhibits extraordinary high concentrations of red and white blood cells for cerebrospinal fluid, compared to the concentration of red blood cells in diluted blood their concentration is still low. Hence, coincidence loss is irrelevant when analysing liquor and preparation of serial dilution is not required. On the other hand, as can be seen from the histogram, the signals due to red and white blood cells interfere with a background, presumably caused by protein agglomerates. To derive va-

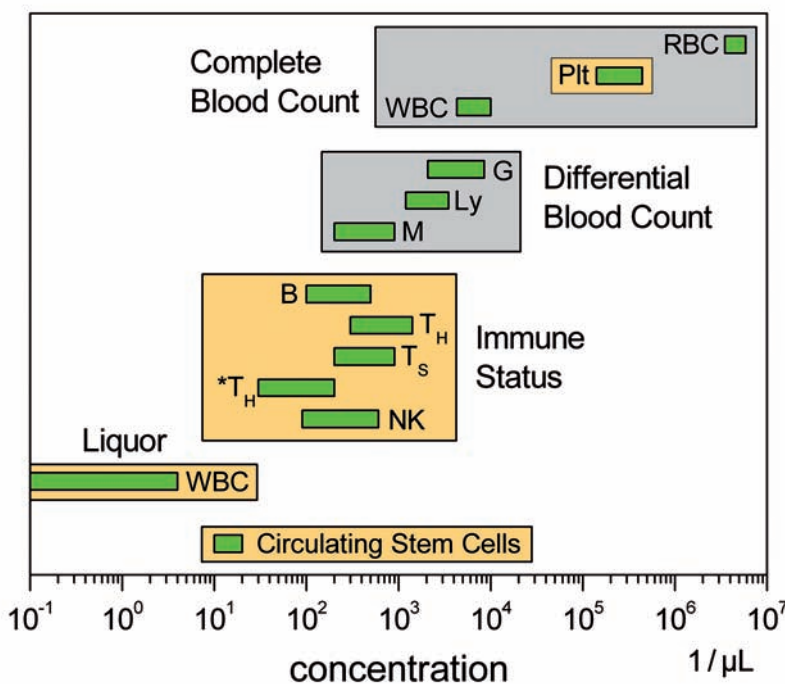
Figure 4:
Histogram of a pathological liquor sample containing erythrocytes (RBC) and leukocytes (WBC).



values for the cell concentrations, the background was modelled as exponentially decreasing function and the cell populations were analysed as logarithmic normal distribution, appearing as Gaussian distribution in the histogram because of the logarithmic amplification. The result of the fit to the experimental data is included as red line in Fig. 4. In addition to impedance counting laser flow cytometry is presently applied to identify cells in liquor samples by light scatter or fluorescence to improve the reliability of cell classification. For specific staining of red and white blood cells, antibodies against CD235a and CD45 are suited, allowing to distinguish both species and to discriminate cell signals from background.

To illustrate the need to develop reference procedures for concentration measurements of (sub-)populations of cells not included in the complete blood count, the concentration of various cell populations is plotted in Fig. 5. The

Figure 5:
Concentration of various cells in blood and leukocyte concentration in cerebrospinal fluid (liquor). The green bars indicate the variation of the concentrations in healthy persons. The rectangular regions indicate the context, in which the corresponding concentrations are determined, e.g. the complete blood count. Cell populations requiring immunological identification are indicated by an orange background. Abbreviations are explained in the text.



logarithmic scale chosen covers 8 orders of magnitude. The green bars reflect the respective variation of the concentrations in healthy humans, which is considerably larger when pathological cases are also considered. Besides the commonly used diagnostic laboratory tests, i.e. the complete blood count, part of the differential blood count and the immune status, summarised in rectangular regions, concentrations of stem cells and leukocytes in liquor were included. Target cells requiring biomolecular identification are indicated with an orange background. Cell concentrations vary from about 5 million red blood cells (RBC) and 250 000 platelets (Plt) to 5000 leukocytes (WBC) per μL for the complete blood count. Differentiation of white blood cells by morphological characterisation using for instance light scatter (see Fig. 2b) allow to distinguish granulocytes (G), monocytes (M) and lymphocytes (Ly). Immunophenotyping, based on labelling leukocytes with different antibodies, serves to measure (relative) concentrations of B- and T-lymphocytes and natural killer (NK) cells and to differentiate T cells in T-helper (T_H), T-suppressor (T_s) and activated helper cells $*T_H$. The development of reference methods for the determination of haematopoietic stem cells, the concentration of which is about 10 per μL in peripheral blood, is important to support quality control when transplanting stem cells [23] in patients treated with high doses of radiation or chemotherapy. In Fig. 5, the lowest concentration is found for white blood cells in normal liquor samples, being smaller than 5 leukocytes per μL . As discussed above, the inclusion of immunological staining would greatly improve discrimination of signals of cells from background and should thus be incorporated in a flow cytometrical reference procedure to determine the concentration of red and white blood cells in liquor. However, because of the large variation of cell types in pathological cohorts, it is to be expected, that flow cytometry has to be complemented by microscopy to obtain reliable reference measurement values in cerebrospinal fluid.

For external quality assurance of haematological laboratories round robin experiments are regularly organised by the Gesellschaft zur Förderung der Qualitätssicherung in medizinischen Laboratorien e.V. (INSTAND e.V.) and the Deutsche Vereinte Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin e.V. (DGKL). The reference measurement values for the concentrations of erythrocytes and leukocytes, determined at the PTB, serve as target values to evaluate the results of routine laboratories. Whereas reference procedures for erythrocyte and leukocyte counting were validated by comparison with other reference laboratories [21, 22], the reference method to measure platelet

concentration is currently tested. The reference methods for flow cytometric enumeration of erythrocytes and leukocytes in normal blood samples are based on the identification and differentiation of cells by their morphological properties like volume, shape or granularity. Platelets in blood samples of healthy persons may cover a volume range from 0,5 fL to 500 fL. Micro-platelets cannot be detected in impedance counters and their light scattering amplitude might be below the detection threshold. On the other hand, signals of large platelets interfere with white blood cells when measuring quantities proportional to the particle volumes. Consequently, the reference methods for the determination of platelet concentration described in DIN 58 932-5 [11f] relies on immunological staining using CD61, CD41 and CD42 antibodies [14, 15]. Apart from platelet identification, reference methods involving immunological staining (see figure 5) offer the potential to develop reference procedures for the concentration of cells relevant for the immune status and measurement of stem cell concentration.

6 References

- [1] Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen (RiLiBÄK), Dt. Ärzteblatt **105**, (2008), A341–A355
- [2] Coulter, W.H.: High speed automatic blood cell counter and cell size analyzer, Proc. Natl. El. Conf. **12**, (1956), 1024–1042
- [3] Kachel, V.: Electrical resistance pulse sizing: Coulter sizing. In: Melamed, M.R., Lindmo, L., Mendelsohn, M.L. (Eds.): Flow Cytometry and Sorting, 2nd Edition, New York, Wiley-Liss, (1990), 45–80
- [4] Shapiro, H.M.: Practical Flow Cytometry 4th Edition, New York, Wiley-Liss, 2003
- [5] Rinneberg, H., Neukammer, J., Ost, V.: Laser-Durchflusszytometer als Normalmesseinrichtung zur Bestimmung der Konzentration von Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten, Lab. med. **19**, (1995), 238–242
- [6] Ruhstroht-Bauer, G. and Zhang, D.: Automatische Zählmethoden: Das Coulter'sche Partikelzählgerät, Blut **6**, (1960), 446–462
- [7] Wales, M. and Wilson, J.N.: Theory of coincidence in Coulter particle counters, Rev. Sci. Inst. **32**, (1961), 1132–1136
- [8] Helleman, P.W.: Chemical and physical aspects of electronic cell counting. In: Izyk, G., Lewis, S.M., Path, M.R.C. (Editors): Modern concepts in Hematology, New York 1972, Academic Press Inc., 164–190
- [9] Jakschik, J. and Schulze, K.: Correction of counting losses due to coincidences in particle counters, PTB-Bericht PTB-MM-5, (1990), ISSN 0721-0906, ISBN 3-89429-003-X, and Jakschik, J. and Schulze, K.: Korrektur koinzidenzbedingter Zählverluste bei Partikelzählgeräten, Labor-Medizin **13**, (1990), 89-96 175-181
- [10] Valet, G.: Past and present concepts in flow cytometry: A European perspective, J. Biological Reg. Homeostatic Agents, (2003), 213–222
- [11] Standardisation committee "Haematology" of the German Institute of Standardisation, Members: J. Neukammer (Chairman), H.-U. Wolf (Assistant chairman), H. Beeser, T. Binder, M. Heiden, S. Heller, M. Kokschi, D. Lerche, V. Ost, T. Reinecke, B. Römer, Ch. Ruby, A. Ruf, A. von Rücker :
 - [11a] DIN 58931: Bestimmung der Hämoglobinkonzentration im Blut – Referenzmethode, Beuth Verlag, Berlin, 1995
 - [11b] DIN 58932-1: Bestimmung der Blutkörperchenkonzentration im Blut, Teil 1: Blutentnahme, Probenvorbereitung, Einflussgrößen, Störfaktoren, Beuth Verlag, 1996
 - [11c] DIN 58932-2: Bestimmung der Blutkörperchenkonzentration im Blut, Teil 2: Kennzeichnende Größen für Erythrozyten (Erythrozytenindizes), Beuth Verlag, 1998
 - [11d] DIN 58 932-3: Bestimmung der Blutkörperchenkonzentration im Blut: Bestimmung der Konzentration der Erythrozyten, Referenzmethode, Beuth Verlag, 1994
 - [11e] DIN 58 932-4: Determination of the concentration of blood corpuscles in blood – Part 4: Reference procedure for the determination of the concentration of leucocytes (in German and English), Beuth Verlag, 2003
 - [11f] DIN 58 932-5: Determination of the concentration of blood corpuscles in blood – Part 5: Reference method for the determination of the concentration of thrombocytes (in German and English), Beuth Verlag, 2007
 - [11g] DIN 58933-1: Bestimmung des Volumenanteils der Erythrozyten im Blut, Teil 1: Zentrifugationsmethode als Referenzmethode, Beuth Verlag, 1995
- [12] International Council for Standardization in Haematology, Members: England, J.M. (Chairman), Rowan, R.M. (Secretary), Assendelft, O.W., Bull, B.S., Coulter, W.H., Fujimoto, K., Groner, W., Jones, A.R., Koepke, J.A., Lewis, S.M., Tatsumi, N., Verwilghen, R.L., McLaren, C.E. (Consultant): Reference method for the enumeration of erythrocytes and leukocytes, Clin. Lab. Haemat. **16**, (1994), 131–138
- [13] Lewis, S.M., England, J.M., and Kubota, F.: Coincidence correction in red blood cell counting, Phy. Med. Biol. **34**, (1989), 1239–1246,

- and Helleman, P.W.: More about coincidence loss and reference methods, *Phys. Med. Biol.* **35**, (1990), 1159–1162
- [14] Dickerhoff, R.; von Ruecker, A.: Enumeration of platelets by multiparameter flow cytometry using platelet-specific antibodies and fluorescence reference particles, *Clin. Lab. Haem.* **17**, (1995), 163–172
- [15] Tanaka, C., Ishii, T, Fujimoto, K.: Flow cytometric platelet enumeration utilizing monoclonal antibody CD42a, *Clin. Lab. Haemat.* **18**, (1996), 265–269
- [16] Ost, V.; Neukammer, J.; Rinneberg, H.: Flow cytometric differentiation of erythrocytes and leukocytes in dilute whole blood by light scattering, *Cytometry* **32**, (1998), 191–197
- [17] Thom R.: Method and results by improved electronic cell sizing. In: *Izyk, G., Lewis, S.M, Path, M.R.C.* (Editors): *Modern Concepts in Hematology*, New York: Academic Press, (1972), 191–200
- [18] Neukammer, J.; Gohlke, C.; Höpe, A.; Wessel, T., Rinneberg, H.: Angular Distribution of Light Scattered by Single Biological Cells and Oriented Particle Agglomerates, *Appl. Opt.* **42**, (2003), 6388–6397
- [19] Hinghofer-Szalkay, H., Holzer, H.: Bestimmung der Hämoglobinkonzentration aus Messungen der Blut- und Plasmadichte mittels der Biegeschwingermethode, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **17**, (1979), 613–618,
- [20] Elster, C., Wöger, W., and Cox, M.: Analysis of key comparison data: Unstable travelling standards, *Measurement Techniques* **48**, (2005), 883–893
- [21] Lerche, D.: L.U.M. GmbH, Rudower Chaussee 29, Berlin, Germany
- [22] Von Rücker, A.: Institut für Klinische Biochemie an der Universität Bonn, Sigmund-Freund-Straße 25, Bonn, Germany
- [23] Bundesärztekammer: Richtlinien zur Transplantation peripherer Blutstammzellen, *Dt. Ärzteblatt* **94**, (1997), A-1584–A1594

Development of microfluidic structures for flow cytometric blood cell differentiation

Marcin Frankowski¹, Andreas Kummrow¹ and Jörg Neukammer²
Andrej Tuchscheerer³ and Martin Schmidt³

1 Introduction

Over the last decade, flow cytometry, a well established high throughput diagnostic tool in haematology and immunology [1, 2], entered a new phase of its evolution taking advantages of the rapidly developing area of microtechnology. The new approach incorporates compact designs based on on-chip integrated measurements in order to determine physical and biological properties of cells and intracellular constituents. In addition, the process of sample preparation can be included as well. Thus, differentiation of single biological particles can be performed in complex while compact microchips integrating fluidics, electrical connectors (electrodes) and optics, which allow particle counting by measuring impedance changes, light scattering and fluorescence (following immunological staining). In effect, several prototype devices allow counting biological cells in microfluidic platforms, the flow channels of which have widths of few hundred micrometers down to tens of micrometers size [3–6]. Used as cartridges for dedicated readout instruments, such disposable microchips could be applied in sterile environments, e.g. during surgery to determine platelet concentration before initiating blood transfusion. Well defined operational parameter ranges for sample volumes and flow rates may provide standardized protocols for complex flow cytometric analyses resulting in better reproducibility and possibly better accuracy of measurements. Furthermore, microfluidic devices can be optimized for specific tasks, like for instance reliable determination of cells concentrations to classify the severity of HIV and malaria [7]. This facilitates applications ranging from point-of-care analyzers for emergency services to portable bedside instruments for rapid and accurate diagnosis at home. Recent technological achievements have already proven an ability to deliver an analytical apparatus based on a variety of microfluidic platforms [8]. Future efforts will aim at developing microchips and read out instruments which can be handled by non-qualified personnel, which then would

further reduce service demands, especially in developing countries.

2 Microfluidics: Two – dimensional hydrodynamic focusing

In order to reliably differentiate cell populations, the pulse height resolution for a given parameter (e.g. light scatter, fluorescence) must be within a few percent. Therefore, it is necessary for flow cytometric analysis to control the two-dimensional positioning of the particles within the flow channel. This is usually done with hydrodynamic focusing forcing those particles in both directions perpendicular to the flow vector to pass the interaction zones in single file. However, lithographic techniques, commonly used in microfabrication limit structures to one specific channel height or when using multilayer lithography to a small number, e.g. three different heights [9]. Planar structures result in one-dimensional hydrodynamic focusing only. Using such structures, coefficients of variation of the pulse height distributions for monodisperse particles are in the range from 25 % to 30 % [10,11], which is much higher than those achieved in conventional instruments [1]. Although the second solution, i.e. multilayer lithography allows for high throughput particle detection with coefficients of variation in the range from 3 % to 10 % [9], it involves a quite challenging method for two-dimensional focusing that requires several sheath fluid inlet ports and maintaining defined pressure differences. As demonstrated here, some of above mentioned limitations due to manufacturing methods can be overcome by exploiting ultra-precision milling technique to produce the micro-machined mould inserts. Hot embossing in polycarbonate substrates (top and bottom plates, 1,5 mm thick) served to fabricate the upper and lower parts of the microfluidic systems, which were subsequently assembled by laser welding. The delicate pressure balance required for hydrodynamic focusing is integrated in the three dimensional structure of the device. The technical details of the design and the fabrication of the presented microfluidic structure including

¹ Dr. Marcin Frankowski, Dr. Andreas Kummrow, Working Group "Flow Cytometry and Microscopy", e-mail: marcin.frankowski@ptb.de

² Dr. Jörg Neukammer, Head of Working Group "Flow Cytometry and Microscopy",

³ Dipl.-Ing. Andrej Tuchscheerer, Prof. Dr. Martin Schmidt, Technische Universität Berlin, Institut für Konstruktion, Mikro- und Medizintechnik, Fachgebiet Mikro- und Feingeräte

the insertion of optical fibres are described in the doctoral thesis [12] of Dr. Janko Theisen.

In Fig. 1, an example of a microfluidic structure with inserted optical fibres and electrodes is shown. The corresponding layout of this microdevice with flow channels, implemented fibre optics and electrical connections is illustrated in Fig. 2. The integration of electrical connections allows differentiation of the cells according to their size by impedance changes induced by particles when passing the region between both electrodes. Preliminary results for monodisperse particles (spheres) revealed increased detection sensitivity when reducing the cross section of the flow channel at the impedance measuring zone. However, a detailed discussion of impedance counting in microfluidic structures is beyond the scope of this article.

Reducing the number of fluidic ports to minimum (i. e. one port for sample fluid, sheath fluid and outlet, respectively) significantly simplified interfacing of the microchip to the fluid supply and waste. In addition, this concept allows easy

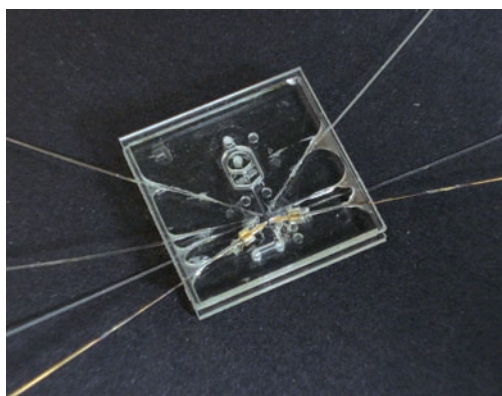
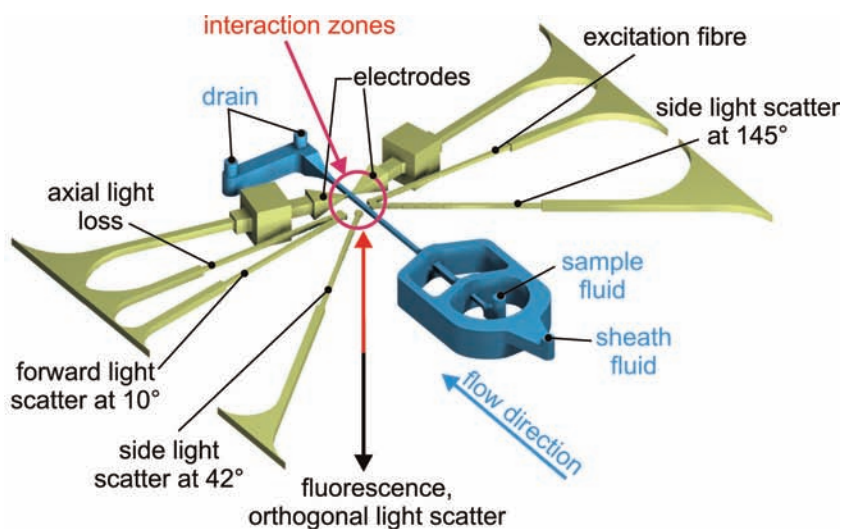


Figure 1: Microfabricated flow cytometer with embedded optical fibres and electrodes. The outer microchip dimensions are 20 mm × 20 mm and its thickness amounts to 3 mm.



adjustment of the flow parameters, being critical to achieve stable hydrodynamic focussing of the cells in the sample stream. The total dimensions of the microchip are 20 mm × 20 mm × 3 mm (width × length × thickness) with a maximum flow channel height of 1 mm. The cross-section and the length of the measuring flow channel amounts to 125 μm × 125 μm and 4300 μm, respectively. Cascaded two-stage hydrodynamic focussing reduces velocity gradients between the sheath and the sample flows and allowed to confine the sample stream within the width from 5 μm to 7 μm in both lateral directions. The latter values were derived from microscopic fluorescence images (directly observed or via an on-chip integrated mirror, not shown in the Fig. 2) when using fluorescent dye solutions as sample fluid. A particle velocity of 3 m/s was obtained at a sheath flow of 1500 μL/min. The corresponding maximum volume throughput for the sample fluid to maintain stable hydrodynamic focussing amounts to 40 μL/min.

3 Optical measurements

Currently two alternative optical excitation pathways are explored. An argon ion laser (Coherent Innova 302) or an optically pumped semiconductor laser (Coherent Sapphire 488-200 CDRH) emitting light at a wavelength of 488 nm were used as excitation sources in both setups. Optical signals were detected with photomultipliers. Suitable optical filter sets allowed for spectral separation and selection of the detected light. In the first setup (I), the light is delivered to the interaction region with a polarization maintaining mono-mode fibre. Thus, the extinction and the light scattered by blood cells can be observed through the multimode fibres placed in the joining plane of the microchip at various polar angles (Fig. 2). Orthogonal light scatter (OLS) and laser-induced fluorescence is collected perpendicular to the joining plane with an external 40× microscope objective (NA = 0,5). When employing the second setup (II) based on epi-illumination, the 40× microscope objective served for optical excitation and fluorescence

Figure 2: Schematic view of the microfluidic flow cell featuring two stage hydrodynamic focussing. The focussing stage and the measuring channel (125 μm × 125 μm) are plotted in blue colour. Yellow features indicate grooves for mounting optical fibres or electrodes. The mono-mode optical fibre is used for excitation while the multi-mode fibres serve to detect the axial light loss or scattered light at indicated polar angles. The orthogonal light scatter and fluorescence is collected perpendicularly to the assembling plane of the microchip by a microscope objective. Two electrodes installed downstream allow to detect impedance changes induced by single particles.

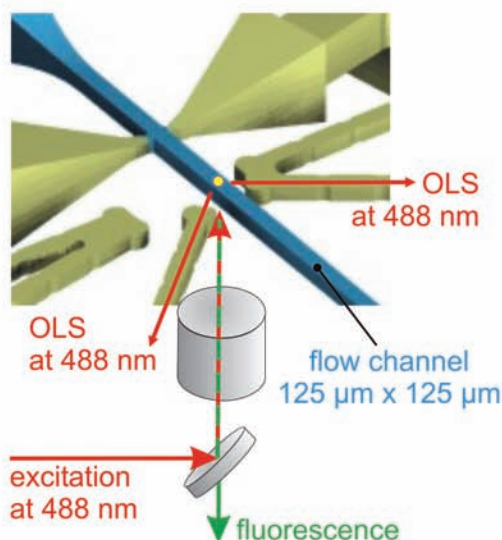


Figure 3:
Expanded view of the interaction zone to observe the fluorescence of labelled cells by means of the external optical pathway for excitation and detection. The optical fibres placed in the joining plane of the microfluidic platform were used to detect the orthogonal light scatter (OLS) at 488 nm.

detection (Fig. 3). In this configuration, each of the multimode optical fibres can be used for OLS detection since the polar angle corresponds to 90° in either case. Although setup I provides a wide range of detection at various polar angles and allows to measure axial light loss, optical excitation power which can be delivered to the flow channel is limited. This restriction arises from the damage threshold of the polycarbonate material. High power densities occur close to the output of mono-mode source fibre because of its small mode field diameter of about $3,8 \mu\text{m}$. This restriction is removed by using the epi-illumination pathway, i. e. setup II. Furthermore, employing external spherical and cylindrical lenses in setup II elliptical shaping of the laser spot and variation of its size in the interaction region of the flow channel is easily achieved. Matching the optical excitation to the fluidic characteristic is essential to reach stable pulse height. This is accomplished by homogenous irradiation of the sample stream, assuring equivalent optical response for all particles crossing laser beam independently of their trace within this stream. All measurement presented in the next section were performed using setup II (Fig. 3). Coefficients of variation obtained for fluorescent calibration particles were similar to those of conventional instruments and amounted to about 3% and 6% for signals intensities of 330 000 MESF and 40 000 MESF units (Molecules of Equivalent Soluble Fluorophore, see [13]), respectively.

4 Blood cell differentiation

Recently, the microchips were used to discriminate red blood cells and platelets by measuring simultaneously light scattering of each cell at two wavelengths of 488 nm and 633 nm [5, 6]. In this contribution we briefly demonstrate differentiation of stained white blood cells (leucocytes) by detection of fluorescence and orthogonally scattered light employing laser radiation at 488 nm. Determination of the concentration of T-helper lymphocytes in blood is important for monitoring the progression of an HIV infection. This specific subgroup of lymphocytes can be identified by immunostaining of the antigen CD4, highly abundant on T-helper cells. This particular test was chosen to demonstrate the capabilities of microfabricated flow cytometers.

The excitation / detection setup used for this application is described above and designated as setup II (Fig. 3). Signals were processed with the Partec CyFlow ML multi-channel data acquisition system. A volume of $100 \mu\text{L}$ of fresh blood, initially treated with anticoagulant was stained with fluorescently labelled monoclonal antibodies. The incubation time amounted to 15 min. Subsequently, the sample was treated by haemolysis to destroy the erythrocytes. Lysing reagents added during haemolysis resulted in dilution of the stained blood sample by a factor of about 10.

Pulse heights caused by blood cells were measured with logarithmic amplification for all quantities. The observed events are visualized in correlated dot plots as shown in Fig. 4. Four different clusters are discernable in each diagram, corresponding to CD4 positive lymphocytes (Ly: CD4+), CD4 negative lymphocytes (Ly: CD4-), monocytes (M) and granulocytes (G). Residual red blood cells, cell debris and electronic noise are plotted as grey dots. Identification of CD4 positive lymphocytes, monocytes and granulocytes was carried out in the dot plot of orthogonal light scatter versus anti-CD4-FITC fluorescence (Fig. 4a) applying gating, i. e. setting borderlines around the respective regions. The intensity of orthogonal light scatter is correlated with the volume and internal structure of cells. Because of their larger volume monocytes (M) exhibit larger intensities of OLS compared to lymphocytes. Although of slightly smaller volume, granulocytes show even higher pulse heights when measuring OLS, due to their large number of intracellular granules giving rise to elevated scattering of light.

The assignment of CD4 negative lymphocytes was achieved using the complementary information in the dot plot in Fig. 4b, where the anti-CD45-PerCP fluorescence is drawn versus the anti-CD4-FITC fluorescence. In this diagram, CD4 negative lymphocytes, e. g. B-lymphocytes

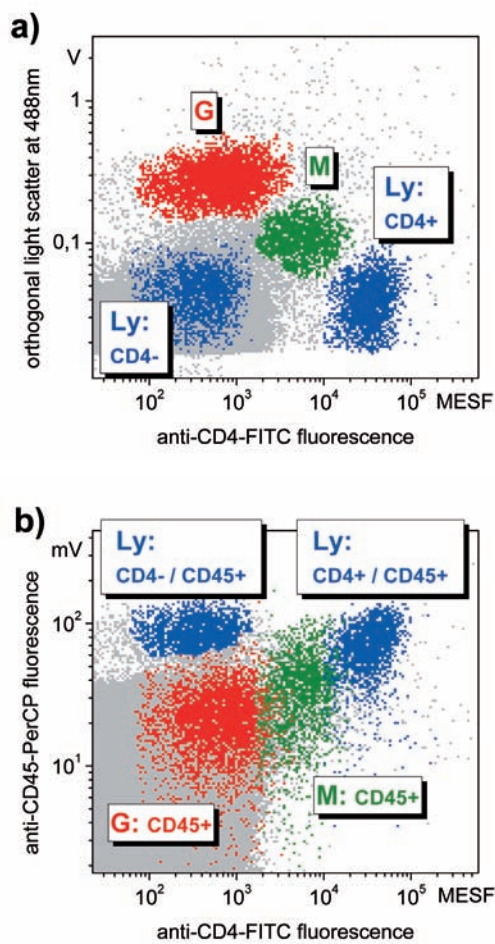


Figure 4:
 Identification of the leucocyte subpopulations, granulocytes (G), monocytes (M) and lymphocytes (Ly) and differentiation of CD4 positive and CD4 negative lymphocytes in the microfluidic flow cell.
 a) Dot plot of anti-CD4-FITC fluorescence and orthogonal light scatter at 488 nm.
 b) Dot plot of anti-CD45-PerCP fluorescence and anti-CD4-FITC fluorescence.
 The FITC fluorescence intensity was calibrated in MESF units (Molecules of Equivalent Soluble Fluorophore) to allow comparison with conventional flow cytometric analysis.

and natural killer cells, are discernable by using an adequate polygon as gate. It should be noted, that different numbers of the CD45 antigens are expressed by all leucocytes. The antibody CD4, used to label the subpopulation of the T-helper lymphocytes, also reacts with monocytes because of their low CD4 expression. Hence, the anti-CD4-FITC fluorescence intensity of monocytes significantly exceeds the (auto-) fluorescence of granulocytes and CD4 negative lymphocytes, as is evident from Fig. 4.

For validation of the analysis, the same sample was investigated on a conventional flow cytometer. In addition to the quantities recorded with the microfluidic structure, forward light scatter was recorded thus allowing the standard protocol for cell identification within the forward versus orthogonal light scattergram [14]. In this

way, the interpretation of the results presented in Fig. 4 was confirmed. In particular, evaluation of data acquired from both instruments revealed the same expression level of 20000 MESF units for the CD4 positive cells.

5 Summary and outlook

Microfluidic structures using mould inserts fabricated by ultraprecision milling feature cascaded hydrodynamic focusing at flow rates which assure high throughput measurements with counting rates up to 10 kHz. Stable hydrodynamic focussing was achieved at particle velocities within the range from 1 m/s to 5 m/s. By using an external optical excitation pathway the pulse height resolution for fluorescence detection was similar to that of conventional flow cytometers. Differentiation of white blood cells stained with fluorescently labelled monoclonal antibodies clearly demonstrates the potential of using such micro flow cytometers for immunologically based cell differentiation.

Integration of mirrors was successfully proven in the microfluidic chip currently being characterised. Such structures with integrated optical components will provide access for optical excitation or detection in the joining plane via external optics. Future development will also involve an increase of the number of optical interaction zones spatially separated along the flow channel. This will permit a successive excitation of a single cell at different wavelengths (e.g. 640 nm and 532 nm) and hence will give access to other commonly used fluorescent reagent mixtures for multiple staining.

Part of the experimental and theoretical work focuses on the development of microfluidic systems for on-chip, fully integrated sample preparation. However, standard staining protocols requiring 15 minutes incubation time are difficult to implement in microfluidic structures for various reasons, e.g. because of cell loss due to adhesion. To select antibodies and conditions to reduce the incubation time, kinetics of different antigen antibody reactions are being investigated [13]. Integration of preparation procedures including sample dilution, haemolysis and immunostaining onto a disposable micro flow cytometer platform would significantly improve the accuracy and simplify measurements. This in turn, could result in new metrological standards in medical diagnosis based on cell counting.

6 Acknowledgement

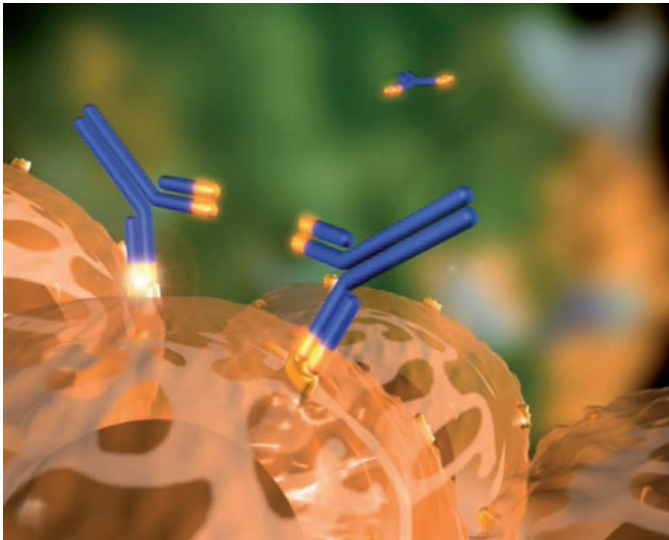
The authors thank Mesrure Baydaroglu and Nicole Bock for supporting the experimental work, data processing and analysis. The research was partially supported by the Investitionsbank Berlin and the European Regional Development Fund (ERDF).

References

- [1] Shapiro, H.M.: Practical Flow Cytometry. Wiley-Liss, New York, 4th edn., 2003
- [2] Nguyen, D.T., Diamond, L.W., Braylan, R.C., Totowa, N.J.: Flow Cytometry in Hematopathology: A Visual Approach to Data Analysis and Interpretation, Humana Press, 2003
- [3] Toner, M., Irimia, D.: Annu. Rev. Biomed. Eng., **7** (2005), 77–103
- [4] D. Huh, W. Gu, Y. Kamotani, J.B. Grotberg and S. Takayama: Physiol. Meas., **26** (2005), R73–R98
- [5] Kummrow, A., Yildirim, H., Theisen, J., Brattke, K., Sprenger, C., Schmidt, M., Neukammer, J.: Proc. SPIE 6633 (2007), 66332C
- [6] Kummrow, A., Yildirim, H., Frankowski, M., Neukammer, J., Theisen, J., Sprenger, C., Schmidt, M.: SPIE Newsroom article, 2007, DOI: 10.1117/2.1200711.0897 <http://spie.org/x17618.xml>
- [7] Krämer, B., Grobusch, M.P., Suttorp, N., Neukammer J., Rinneberg, H.: Cytometry, **45** (2001), 133–140
- [8] For instance <http://www.agilent.com>
- [9] Simonnet, C., Groisman, A.: Anal. Chem., **78** (2006), 5653–5663
- [10] Wang, Z., El-Ali, J., Engelund, M., Gotsæd, T., Perch-Nielsen, I.R., Mogensen, K.B., Snakenborg, D., Kutter, J.P., Wolff, A.: Lab Chip, **4** (2004), 372–377
- [11] Pamme, N., Koyama, R., Manz, A.: Lab Chip, **3** (2003), 187–192
- [12] Theisen, J.: Ein neuartiges 3-D-mikrostrukturiertes Durchflusszytometer. Dissertation, TU Berlin, 2007
- [13] Schädel, S., Kummrow, A., Neukammer, J.: PTB-Mitteilungen **118** (2008), 248–254
- [14] Ost, V., Neukammer, J., Rinneberg, H.: Cytometry **32** (1998), 191–197

Erste Untersuchungen zur Kinetik von Antigen-Antikörper-Reaktionen bei der immunologischen Färbung von Blutzellen

Sandra Schädel¹, Andreas Kummrow¹, Jörg Neukammer²



Immunologische Reaktion an der Oberfläche einer Blutzelle [1].

Eine Blutanalyse aus diagnostischen oder therapeutischen Gründen kann für jeden betroffenen Patienten lebensrettend sein. Voraussetzung hierfür ist eine zuverlässige klinische Routineanalytik. Die Grundlage für die vertrauenswürdige Angabe verschiedener Messgrößen in der Medizin bildet die Rückführung medizinischer Messungen auf nationale Normale oder die Charakterisierung von Kontrollmaterialien mittels Referenzverfahren. Mindestanforderungen an die Messgenauigkeit von Analysen sowie deren Kontrolle und Bewertung werden in der „Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung quantitativer laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen“ festgelegt [2].

Die PTB ermittelt beispielsweise für die seit 2002 vorgeschriebenen Ringversuche zum „Kleinen Blutbild“ Referenzwerte für die Konzentrationen der Erythrozyten (rote Blutkörperchen), Thrombozyten (Blutplättchen) und Leukozyten (weiße Blutkörperchen) [3]. Diese Werte werden von den medizinischen Landesorganisationen bei der Durchführung der Ringversuche zur externen Qualitätssicherung der hämatologischen Laboratorien Deutschlands verwendet.

1 Motivation

Zur Zelldifferenzierung in der Hämatologie und der Immunologie kommen Durchflusszytometer zum Einsatz. Dabei werden in der Regel in Hämatologieanalysatoren Messzellen eingesetzt, bei denen die Blutzellen durch die Änderung der Impedanz beim Durchtritt durch die Messöffnung nachgewiesen und anhand ihres Volumens differenziert werden. Für immunologische Untersuchungen werden Laser-Durchflusszytometer verwendet und mit Antikörpern spezifisch markierte Blutzellen durch die Messung der laser-induzierten Fluoreszenz nachgewiesen. Diese Diagnostik spielt bei einer Vielzahl von Indikationen eine wichtige Rolle [4], beispielsweise bei der Klassifizierung akuter Leukämien [5]. Die durchflusszytometrische Zelldifferenzierung wird bei ungewöhnlichen Ergebnissen gegebenenfalls um mikroskopische Untersuchungen ergänzt.

Die Bestimmung von Referenzmesswerten der Konzentrationen an Erythrozyten und Leukozyten ist in DIN 58932-3 [6] und DIN 58932-4 [7] beschrieben. Beide Referenzverfahren beziehen sich auf normale Blute, bei denen die Targetzellen anhand ihres Volumens in Impedanz-Zellzählgeräten oder ihrer Streulichtintensität, d. h. anhand morphologischer Eigenschaften, in optischen Instrumenten, identifiziert werden. Um den Anwendungsbereich der Referenzmethoden auf die Untersuchung pathologischer Fälle zu erweitern, wird derzeit ein Referenzverfahren zur Bestimmung der Thrombozytenkonzentration [8] erprobt, bei dem der Nachweis der Targetzellen durch immunologische Färbung, d. h. auf Grundlage von Antigen-Antikörper-Reaktionen, erfolgt. Diese Art der Identifikation ist erforderlich, da die Volumina der Thrombozyten stark variieren. Kleine Thrombozyten (Mikrothrombozyten) mit einem Volumen von nur 0,5 fL liegen bei Impedanz- und Streulichtmessungen unterhalb der Nachweisgrenze, bei großen Thrombozyten (Makrothrombozyten) kommt es zur Überlagerung mit Leukozyten (Volumina

¹ Dr. Sandra Schädel, Dr. Andreas Kummrow, Arbeitsgruppe „Durchflusszytometrie und Mikroskopie“
E-mail: sandra.schaedel@ptb.de

² Dr. Jörg Neukammer, Leiter der Arbeitsgruppe „Durchflusszytometrie und Mikroskopie“

von ca. 250 fL). Die Identifikation der Thrombozyten durch immunologische Färbungen ist insbesondere bei der Messung geringer Thrombozytenkonzentrationen erforderlich, da durch eine spezifische Markierung die Unterscheidung der Thrombozyten von anderen Zellen erheblich einfacher ist als anhand von morphologischen Zelleigenschaften. Möglichst geringe Messunsicherheiten sind in diesen Konzentrationsbereichen notwendig, da die ermittelten Werte beispielsweise über die Transfusion von Thrombozyten-Konzentrationen entscheiden. Der Grenzwert hierfür hängt von der Indikation ab und liegt typischerweise bei 10 000 Thrombozyten pro Mikroliter. Unterhalb dieser Konzentration können Spontanblutungen auftreten.

Ein wesentlicher Aspekt, der die Entwicklung neuer Referenzverfahren zur Bestimmung der Konzentration von Blutzellen betrifft, ist die Quantifizierung der eingesetzten Antikörpermenge bei der spezifischen Färbung von Zellen. Ist die Antikörpermenge zu gering, können die Targetzellen von den übrigen Zellen nicht zuverlässig unterschieden werden. Wird andererseits eine zu große Menge an Antikörpern zur Färbung eingesetzt, kommt es zur unspezifischen Färbung von Zellen, so dass auch in diesem Fall eine Differenzierung erschwert ist. Zur Optimierung der Antikörperkonzentration wurden daher Titrationsreihen gemessen.

In der Arbeitsgruppe „Durchflusszytometrie und Mikroskopie“ werden derzeit in Zusammenarbeit mit dem Institut für Konstruktion, Mikro- und Medizintechnik der Technischen Universität Berlin mikrofluidische Strukturen zur durchflusszytometrischen Analyse von Blutzellen entwickelt und erprobt [9]. In diesen Strukturen soll im weiteren Verlauf der Arbeiten zusätzlich zur durchflusszytometrischen Zelldifferenzierung die immunologische Markierung von Zellen vorgenommen werden. Um zu klären, bei welchen Inkubationszeiten eine zuverlässige Trennung der mit den Antikörpern reagierenden von den nicht reagierenden Zellen möglich ist, wurde mit der Untersuchung der Kinetiken verschiedener Antigen-Antikörper-Reaktionen begonnen.

2 Prinzip der Analyse

Bei der immunologischen Färbung wird die Spezifität von Antikörpern ausgenutzt, um die Zellen anhand ihrer auf der Oberfläche exprimierten, zelltypischen Antigene zu identifizieren. Antikörper (Immunglobuline) sind Proteine, die im Wirbeltierorganismus als Reaktion auf eingedrungene Fremdstoffe, die Antigene, gebildet werden. Sie sind zentrale Bestandteile des Immunsystems. Antigene sind Proteine, die zur Bildung der entsprechenden Antikörper führen (*antibody generating*). Der Wirkmecha-

nismus der Komplexbildung zwischen Antigen und Antikörper (Antigen-Antikörper-Reaktion) basiert auf dem so genannten „Schlüssel-Schloss-Prinzip“. Damit der gebildete Komplex im Durchflusszytometer optisch nachweisbar ist, wird der Antikörper mit einem Fluorophor (Fluoreszenzfarbstoff) markiert (Bild 1). Über die Bildung derartiger fluoreszierender Antigen-Antikörper-Komplexe lassen sich Zellpopulationen differenzieren [10, 11].

Da eine Zelle verschiedene Antigene auf ihrer Oberfläche exprimieren kann und in den vergangenen Jahrzehnten weit über Hundert dieser Spezies entdeckt wurden, hat man die immunphänotypischen Oberflächenmerkmale von Zellen in Gruppen nach biochemischen und funktionellen Kriterien in Differenzierungscluster (CD, Cluster of Differentiation) zusammengefasst. Verschiedene CD-Moleküle können spezifisch für eine bestimmte Sorte oder Entwicklungsstufe von Zellen sein. Das Vorhandensein spezifischer CD-Moleküle wird durch die Markierung mit korrespondierenden monoklonalen Antikörpern erkannt und auf diese Weise nachgewiesen. So fungiert beispielsweise CD45 als Leukozyten-Marker. Zur Identifikation von Thrombozyten werden gegen CD41, CD42a und CD61 gerichtete Antikörper verwendet. Kommerziell erhältliche monoklonale Antikörper sind mit verschiedenen Fluorophoren gekoppelt, z. B. anti-CD61-FITC (FITC, Fluoresceinisothiocyanat) [12, 13].

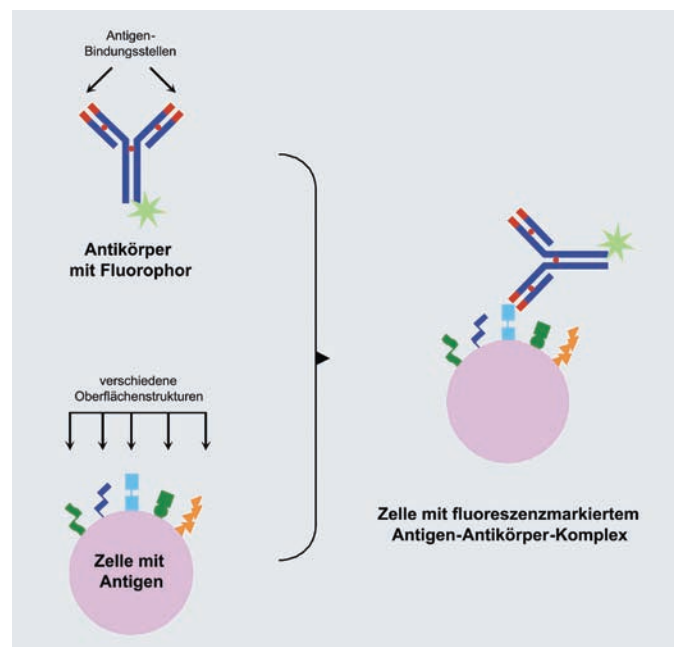


Bild 1: Schematische Darstellung der Wechselwirkung zwischen Antigen und Antikörper bei der immunologischen Färbung von Zellen (nicht maßstabgetreu). Polyklonale Antikörper können sich an unterschiedliche Oberflächenstrukturen (Epitope) des Antigens binden. Monoklonale Antikörper sind auf ein ganz spezifisches Epitop spezialisiert.

In Bild 2 ist das Histogramm einer mit anti-CD61-FITC gefärbten Frischblutprobe dargestellt, in welchem die Häufigkeit der registrierten Zellen gegen die Fluoreszenzintensität von FITC ($\lambda_{\text{Emission}} = 535 \text{ nm}$ / volle Halbwertsbreite der Detektion 35 nm) aufgetragen wurde. Um den dynamischen Bereich der Fluoreszenzsignale abzudecken, wird ein logarithmischer Verstärker verwendet. Die auf der Abszisse angegebenen Kanalzahlen des Analog-Digital-Konverters sind damit proportional zum Logarithmus der Fluoreszenzintensität. Das Histogramm zeigt zwei Verteilungen, die den nicht gefärbten Zellen (CD61-negativ) bei geringen Fluoreszenzintensitäten und den Thrombozyten (CD61-positiv) bei hohen Fluoreszenzintensitäten entsprechen. Die CD61-negativen Zellen beinhalten die Erythrozyten und Leukozyten. Die Leukozyten, deren Konzentration etwa 1000 Mal geringer als die der Erythrozyten ist, weisen ähnliche Fluoreszenzintensitäten wie die Erythrozyten auf. Aufgrund ihrer spezifischen Färbung lassen sich die Thrombozyten von den Erythrozyten und Leukozyten separieren und identifizieren. Bei der Messung wurden die Einstellungen des Durchflusszytometers so gewählt, dass auch die nicht gefärbten Zellen detektiert werden. Das Fluoreszenzsignal wird dabei durch die intrinsische Fluoreszenz bestimmter Moleküle in den Zellen hervorgerufen und als Autofluoreszenzsignal bezeichnet. Für die Quantifizierung der Thrombozytenkonzentration nach DIN 58932-5 [8] muss die Detektionsschwelle bei der Fluoreszenzdetektion so hoch eingestellt werden, dass der überwiegende Teil der CD61-negativen Zellen nicht registriert wird. Dies verringert koinzidenzbedingte Zählverluste und ermöglicht deren Korrektur durch die Messung von Verdünnungsreihen [3].

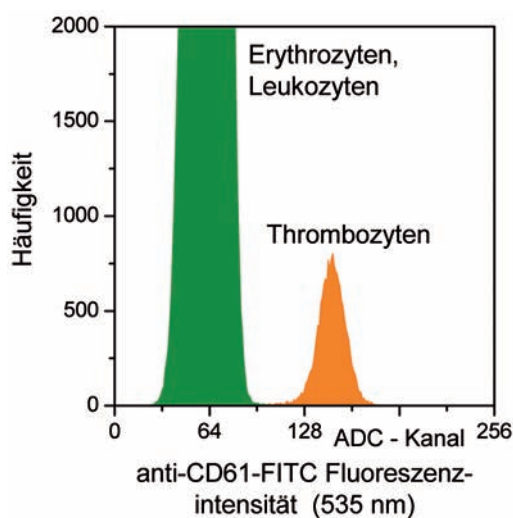


Bild 2:
Histogramm zur Identifizierung von Thrombozyten durch spezifische Antikörpermarkierung (100 μL Blut, 20 μL anti-CD61-FITC, 1200 s Inkubationszeit).

3 Kalibrierung der Fluoreszenzintensität

Um die Vergleichbarkeit verschiedener Messungen zu ermöglichen, ist die Quantifizierung der mittels eines Durchflusszytometers detektierten Fluoreszenzsignale erforderlich. In der Durchflusszytometrie ist es dabei üblich, die Kalibration unter Verwendung fluoreszierender Mikropartikel bekannter Fluoreszenzintensität durchzuführen. Hierbei handelt es sich um eine Mischung von Mikropartikeln, deren unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten in Einheiten, die sich auf die Helligkeit von einzelnen gelösten Farbstoffmolekülen beziehen (MESF, molecules of equivalent soluble fluorophore [14]), vom Hersteller angegeben werden. Die Kalibrierung beinhaltet die Umrechnung der Fluoreszenzintensität gemessen in ADC-Kanälen (Kanalnummern, in die die Fluoreszenzsignale einsortiert werden) in die Fluoreszenzintensität gemessen in MESF-Einheiten. Ein Beispiel einer Kalibrierung ist in Bild 3 aufgeführt. In dem Histogramm in Bild 3a ist die Häufigkeit der Zellen als Funktion der Fluoreszenzintensität des Farbstoffes FITC aufgetragen, wobei als Abszisse die dem Logarithmus der Fluoreszenzintensität proportionale Kanalzahl (ADC-Kanal) verwendet wurde. Für die Markierung der Zellen kam der für die Thrombozyten spezifische Antikörper CD61 zum Einsatz. Das Bild 3b zeigt das Histogramm der Kalibrationspartikel, in dem insgesamt acht Verteilungen unterschiedlicher Fluoreszenzintensitäten zu erkennen sind. Zur Bestimmung der Schwerpunkte wird an jede der Verteilungen im Histogramm eine Gauß-Funktion angepasst. Das Ergebnis der Anpassung ist in Bild 3b als roter Kurvenverlauf dargestellt. Die ermittelten Schwerpunkte der entsprechenden Kanalzahlen ($N_{\text{ADC-Kanal}}$) sind in Bild 3c als Funktion der vom Hersteller angegebenen MESF-Einheiten (I_{MESF}) aufgetragen. Unter Verwendung der Beziehung $N_{\text{ADC-Kanal}} = a + b \cdot \log(I_{\text{MESF}})$ werden die Messwerte interpoliert. Bei der Anpassung der Parameter a und b wird die Halbwertsbreite der Verteilungen als Abschätzung für die Messunsicherheiten berücksichtigt. Aus der Umkehrfunktion $I_{\text{MESFcalc}} = 10^{(N_{\text{ADC-Kanal}} - a)/b}$ lässt sich die Skala konvertieren und die Fluoreszenzintensität in (berechneten) MESFcalc-Einheiten (I_{MESFcalc}) angeben. Die Bezeichnung MESFcalc wurde gewählt, da aufgrund der Anpassung im Rahmen der Kalibration die Schwerpunkte der Verteilungen bei anderen als den vom Hersteller angegebenen MESF-Einheiten liegen. Das Ergebnis der Kalibration ist in Bild 3d dargestellt. Hieraus geht deutlich hervor, dass die Thrombozyten bei der untersuchten Probe im Mittel um fast zwei Größenordnungen stärker fluoreszieren als die Erythrozyten und Leukozyten.

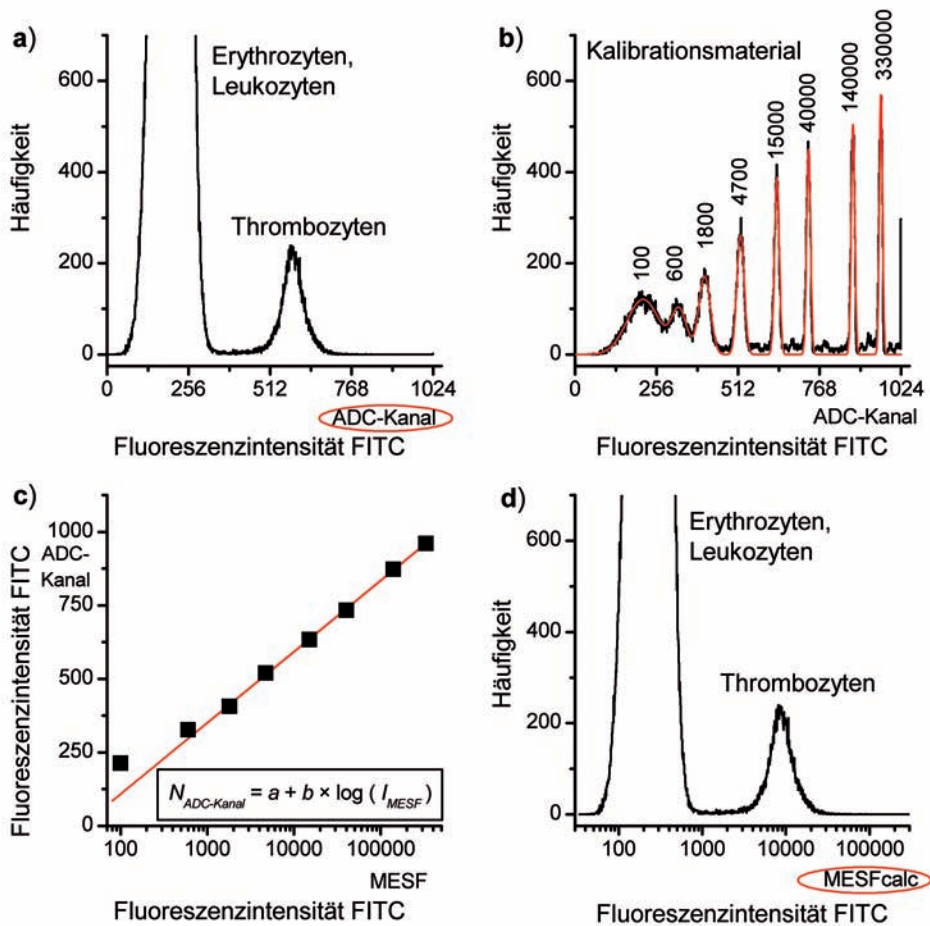


Bild 3:

Verfahren zur Kalibrierung der Fluoreszenzintensität in MESFcalc-Einheiten.

- Histogramm der originalen Messdaten einer mit anti-CD61-FITC gefärbten Frischblutprobe. Die Fluoreszenzintensität jeder Zelle wurde bei 535 nm (volle Halbwertsbreite 35 nm) detektiert, logarithmisch verstärkt und in einen der ADC-Kanäle einsortiert.
- Histogramm des verwendeten Kalibrationsmaterials. Die rote Kurve ist das Resultat einer Anpassung von Gauß-Funktionen. Die Zahlen über den jeweiligen Verteilungen entsprechen der Herstellerangabe der Fluoreszenzintensitäten in MESF-Einheiten.
- Darstellung der Schwerpunkte der Verteilungen in ADC-Kanälen als Funktion der vom Hersteller angegebenen MESF-Einheiten. Der rote Kurvenverlauf wurde durch Anpassung der in der Grafik angegebenen Funktion bestimmt.
- Histogramm der in a) gezeigten Probe mit der Fluoreszenzintensität in den berechneten MESFcalc-Einheiten.

4 Titration – Variation der Antikörpervolumina

Bei immunologischen Markierungen definiert man die höchste Verdünnung eines Antiserums (oder monoklonalen Antikörpers), mit der unter spezifischen Testbedingungen eine maximale Anfärbung bei minimalem Hintergrund erzielt wird, als Antikörpertiter. Unter Anwendung dieser Konzentration wird während der Messung ein optimales Signal-Rausch-Verhältnis gewährleistet. Bei monoklonalen Antikörpern kann die absolute Antikörper-Konzentration durch Titration bestimmt werden. Optimale Verdünnungen variieren von 1:10 bis 1:1000. Man bestimmt sie, indem man zuerst eine Inkubationszeit festlegt und dann kleine Volumina einer experimentellen Verdünnungsreihe herstellt. Aufgrund ihres isoelektrischen Punktes und ihrer molekularen Konformation sind monoklonale Antikörper empfindlich in Bezug auf pH-Wert und Ionen-

gehalt des Verdünnungspuffers. Mitunter sind die durch unterschiedliche Verdünnungsvarianten erzielten Färberegebnisse ähnlich oder sogar gleichwertig. In diesem Fall können für Anwendungen in der Routinediagnostik die Reagenzienkosten zu einem entscheidenden Faktor bei der Auswahl der geeigneten Konzentration werden.

Als Beispiel für eine Titrationsreihe (Messung der volumenabhängigen Fluoreszenzintensität) ist in Bild 4 die Färbung von Lymphozyten mit anti-CD45-FITC aufgeführt. Hierzu wurden jeweils 100 µL Frischblut mit variablen Anteilen (0 bis 50 µL) Färbereagenz versetzt und 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss daran wurde der Ansatz lysiert (Auflösung der äußeren Zellmembran) und die Zellsuspension am Durchflusszytometer vermessen.

In Bild 4 ist die Häufigkeit der Ereignisse in Abhängigkeit vom Volumenanteil an Färbereagenz (Volumen Färbereagenz / Gesamt-

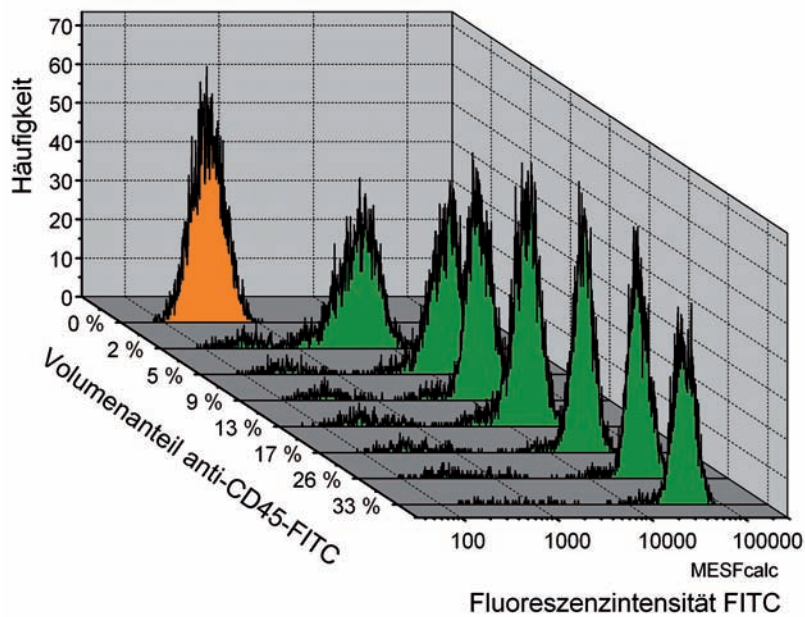


Bild 4: Messung einer Titrationsreihe für die Färbung der Lymphozyten einer Blutprobe mit anti-CD45-FITC-Färbereagenz (100 μ L Blut, 0 bis 50 μ L anti-CD45-FITC, 1200 s Inkubation).

volumen) anti-CD45-FITC und der detektierten Fluoreszenzintensität dargestellt. Die Häufigkeitsverteilung reflektiert die Subpopulation der Lymphozyten, die durch Eingrenzung der entsprechenden Region im simultan registrierten Streudiagramm der Vorwärts- und Seitwärtsstreuung von den übrigen Leukozyten (Granulozyten und Monozyten) unterschieden wurde [3]. Anhand der Abbildung wird deutlich, dass bei einer Inkubationszeit von 1200 Sekunden und einer sukzessiven Verminderung der Konzentration an Färbereagenz bis zu einem Volumenanteil von ca. 5 % keine signifikante Abnahme der Fluoreszenzintensität zu verzeichnen ist und sich die Targetzellen, d.h. die Lymphozyten, von Zellen, die nicht mit anti-CD45 reagieren (Erythrozyten und Thrombozyten), unterscheiden lassen. Unter Beachtung der Empfehlung des Herstellers mit einem Volumenanteil von 17 % zu arbeiten, wird hieran erkennbar, dass unter den gegebenen Bedingungen eine Reduktion der Konzentration an Färbereagenz auf etwa ein Drittel ohne eine signifikante Verringerung der Fluoreszenzintensität möglich ist. Erst unterhalb eines Volumenanteils von 5 % erfolgt eine sichtbare Abnahme des detektierten Fluoreszenzsignals.

5 Färbekinetik – Variation der Inkubationszeit

Zwischen der Inkubationszeit und der Antikörperkonzentration besteht ein reziprokes Verhältnis, d.h. je höher die Antikörperkonzentration, desto kürzer ist die Inkubationszeit zur vollstän-

digen Markierung der Targetzellen. Gebräuchliche Inkubationszeiten liegen in einem Zeitfenster von 10 bis 60 Minuten. Sie können aber auch bis zu mehrere Stunden betragen. Sollen Antikörper innerhalb kurzer Zeit an ihre Antigenen binden, müssen sie sowohl in relativ hoher Konzentration vorliegen als auch eine hohe Affinität besitzen.

Ein Beispiel einer kinetischen Messung (Messung der zeitabhängigen Fluoreszenzintensität) für die Färbung von Thrombozyten ist in Bild 5 dargestellt. Hierfür wurden jeweils 100 μ L Frischblut mit 20 μ L anti-CD61-FITC versetzt und unterschiedlich lange (0 bis 2700 s) bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss daran wurde der Ansatz mit isotoner Kochsalzlösung auf ein Volumen von 3 mL aufgefüllt und die Zellsuspension am Durchflusssystem vermessen.

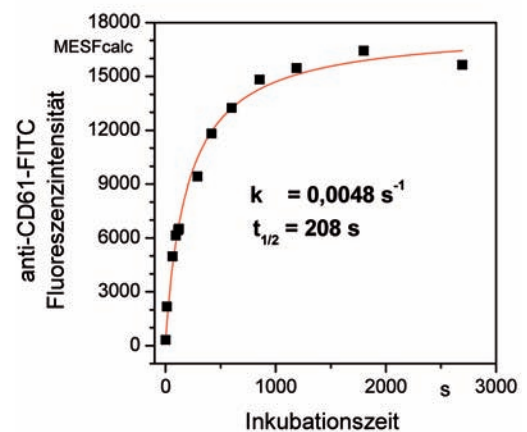


Bild 5: Messung der Kinetik für die Thrombozyten-Färbung einer Blutprobe mit anti-CD61-FITC-Färbereagenz (100 μ L Blut, 20 μ L anti-CD61-FITC, 0 bis 2700 s Inkubation).

Der Kurvenverlauf wurde mathematisch mit einer hyperbolischen Funktion modelliert:

$$I(t) = I_{\text{auto}} + I_{\infty} \left(1 - \frac{1}{1 + kt} \right) \quad (1)$$

$I(t)$ stellt die Amplitude der Fluoreszenzintensität zum Zeitpunkt t , I_{∞} die maximale Amplitude für $\rightarrow \infty$ und k die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion dar. Der Kehrwert $1/k$ entspricht der Halbwertszeit $t_{1/2}$. Der Term I_{auto} charakterisiert die Autofluoreszenz der Zellen und gibt die vertikale Verschiebung entlang der Ordinate wieder. Ausgehend von einer bimolekularen Gleichgewichtsreaktion des Typs



(mit A – Antigen, Y – Antikörper, YA – Antigen-Antikörper-Komplex) entspricht die oben angegebene Funktion (Gleichung 1), die im Bereich der Pharmakokinetik häufig Anwendung findet [15, 16, 17], der Inaktivierung eines Antikörpers nach aktiver Immunisierung.

In dem aufgeführten Beispiel (Bild 5) beträgt die Halbwertszeit 208 Sekunden entsprechend $k = 0,0048 \text{ s}^{-1}$. Die durch immunologische Färbung erreichbare maximale Amplitude des Schwerpunktes der Fluoreszenzverteilung entspricht 17 000 MESF-Einheiten bei einer Autofluoreszenz der Thrombozyten von 300 MESF-Einheiten. Aus der Abbildung geht hervor, dass nach ca. 1500 Sekunden annähernd ein Gleichgewichtszustand erreicht wird. Mit dem Begriff „Gleichgewicht“ wird hierbei die Sättigung des verfügbaren Antigens mit Antikörper bezeichnet. Dabei ist zu beachten, dass eine Verlängerung der Inkubationszeit über den Sättigungspunkt hinaus kaum eine weitere Verbesserung des Färberesultats bewirkt.

Eine entsprechende Kinetik für die Leukozyten-Färbung ist in Bild 6 wiedergegeben. Da anti-CD45-FITC die drei Subpopulationen der Leukozyten – Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten – gleichermaßen markiert und die Fluoreszenzverteilungen überlappen, erfolgte die Differenzierung der Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten wie oben angegeben durch Eingrenzung im simultan registrierten Streudiagramm der Vorwärts- und Seitwärtsstreuung.

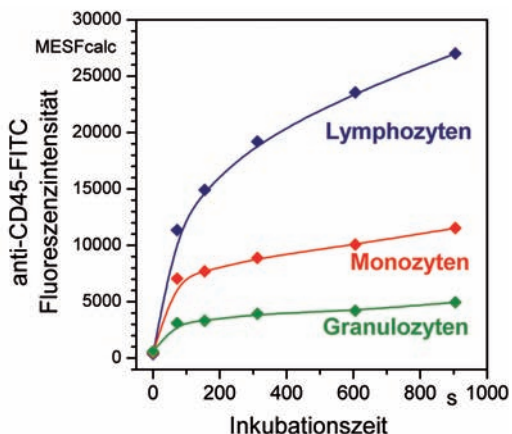


Bild 6: Messung der Kinetik für die Leukozyten-Färbung einer Blutprobe mit anti-CD45-FITC-Färbereagenz (100 μL Blut, 20 μL anti-CD45-FITC, 0 bis 900 s Inkubation). Die drei Subpopulationen (Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten) sind separat aufgeführt.

Die ermittelten Halbwertszeiten betragen für alle drei Kurvenverläufe annähernd 150 Sekunden. Deutlich erkennbar sind die sich unterscheidenden maximalen Amplituden, deren Ursache in der unterschiedlichen Anzahl der auf der Zelloberfläche exprimierten CD45-Antigene begründet liegt. In dem untersuchten Zeitbereich steigt das Fluoreszenzsignal für die Lymphozyten und Monozyten kontinuierlich an, was bedeutet, dass sich in diesem Zeitintervall kein Gleichgewichtszustand zwischen Antigen und Antikörper einstellt. Längere Inkubationszeiten als

900 Sekunden wären in diesem Fall für eine Sättigung notwendig. Nichtsdestotrotz spiegelt sich anhand der Messung wider, dass sich auch bei kürzeren Inkubationszeiten (z. B. für $t \approx 200 \text{ s}$) die Targetzellen untereinander und von den übrigen, nicht gefärbten Zellen differenzieren lassen. Dabei muss die Breite der Verteilungen aufgrund der biologischen Variation der Antigenexpression und die Anzahl der tolerierbaren Fehlzuordnungen berücksichtigt werden.

6 Weitere Einflussgrößen

Einen für weitere Untersuchungen wichtigen Parameter im Färbeprotokoll stellt die Inkubationstemperatur dar. Bei 37 °C beispielsweise erfolgt die Einstellung des Gleichgewichtes der Antigen-Antikörper-Reaktion in deutlich kürzerer Zeit als bei Raumtemperatur, so dass eine erhöhte Inkubationstemperatur eine stärkere Antikörperverdünnung oder eine verkürzte Inkubationszeit ermöglicht. Für bestimmte Anwendungen werden Antigen-Antikörperreaktionen bei 4 °C mit entsprechend erhöhten Inkubationszeiten (12 bis 18 Stunden) durchgeführt, um das Verhältnis von spezifischer Markierung zu unspezifischer Färbung zu verbessern. Im Einzelfall muß überprüft werden, ob der Parameter Temperatur die spezifische Reaktion zwischen Antigen-Antikörper selektiv begünstigt oder in gleicher Weise unspezifische Bindungen beeinflusst.

Weiterhin ist es in Verbindung mit der durchflusszytometrischen Detektion der Zellen notwendig, Kreuzreaktivitäten zu analysieren. Diese werden durch unspezifische Bindungen der Antikörper an Oberflächenproteine der Zellen verursacht und führen zu einer Erhöhung der gemessenen Fluoreszenzsignale.

7 Resümee

Die Verfügbarkeit von Antisera und monoklonalen Antikörpern für eine wachsende Anzahl klinisch relevanter Zellantigene hat zu einer enormen Erweiterung des immunologischen Repertoires im Bereich der medizinischen Diagnostik geführt. Auf dieser Basis erweist sich die Kombination immunologischer Färbemethoden mit der Durchflusszytometrie als aussichtsreicher Ansatz zur Blutzellzählung. Von besonderem Interesse ist hierbei die Optimierung der experimentellen Protokolle mit dem Ziel der Entwicklung von Referenzverfahren und der Erweiterung des Messbereiches für kleine Konzentrationen.

Als potentielle Anwendung der optischen Zellzählung unter Verwendung immunologischer Markierungen sei die Bestimmung von Referenzwerten der Konzentration von Lymphozytensubpopulationen (T-Helfer-Zellen) für die HIV-Diagnostik und Therapie, die Stammzell-

zählung in der Transplantationsmedizin oder die Analyse der Anzahl an Restleukozyten in Blutkonserven erwähnt. Eine weitere Entwicklung ist die Automatisierung der Methodik durch Einbindung der Färbereaktionen in mikrostrukturierte Durchflusszytometer mit integrierter Probenpräparation [9]. Bei den sogenannten „Lab-on-a-chip“-Färbungen ist es unerlässlich, für die entsprechende Färbereaktion die vorliegenden Konzentrationsverhältnisse sowie eine formale Kinetik beschreiben zu können, mit dem Ziel, die erforderlichen Funktionsparameter der zu konstruierenden Mikromischkammer festzulegen. Die Integration der immunologischen Färbung in mikrofluidische Systeme dient der Verbesserung der Standardisierung der Messungen und demzufolge der Sicherung der Vergleichbarkeit der Ergebnisse zwischen den verschiedenen Laboratorien.

8 Danksagung

Die Autoren bedanken sich für die Unterstützung bei der Durchführung der Messungen und der Datenanalyse bei Frau Nuran Özdemir, Frau Hülya Yildirim und Herrn Dr. Marcin Frankowski. Das Projekt wurde zum Teil durch die Investitionsbank Berlin und den Europäischen Fond für regionale Entwicklung (EFRE) finanziert.

9 Literatur

- [1] Quelle: www.handzeichen-gegen-krebs.de/download/Andocken_Antikoerper.jpg
- [2] Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen (RiLiBÄK), Dt. Ärzteblatt **105**, (2008) A341–A355
- [3] Neukammer, J., John, M., Kummrow, A., Reitz, S., Schädel, S., Schulze, K., and Witt, K.: Reference Procedures for the Determination of Cell Concentrations in Body Fluids, PTB-Mitteilungen **118** (2008) S. 236–242
- [4] Sack, U., Tárnok, A., und Rothe, G. (Hrsg.): Zelluläre Diagnostik: Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie. (2007) Karger, Basel, S. 703–1093
- [5] Ratei, R., Nebe, T., Schabath, R., Kleine, H.-D., Karawajew, L., und Ludwig, W.-D.: Akute Leukämien. In: Sack, U., Tárnok, A., Rothe, G. (Hrsg.): Zelluläre Diagnostik: Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie. (2007) Karger, Basel, S. 946–1000
- [6] DIN 58932-3: Hämatologie – Bestimmung der Blutkörperchenkonzentration im Blut – Bestimmung der Konzentration der Erythrozyten; Referenzmethode. 1994-04
- [7] DIN 58932-4: Hämatologie – Bestimmung der Blutkörperchenkonzentration im Blut – Teil 4: Referenzverfahren zur Bestimmung der Konzentration der Leukozyten. 2003-07
- [8] DIN 58932-5: Hämatologie – Bestimmung der Blutkörperchenkonzentration im Blut – Teil 5: Referenzverfahren zur Bestimmung der Konzentration der Thrombozyten. 2007-10
- [9] Frankowski, M., Kummrow, A., Neukammer, J., Tuchscheerer, A., and Schmidt M.: Development of microfluidic structures for flow cytometric blood cell differentiation, PTB-Mitteilungen **118** (2008), S. 243–247
- [10] Voet, D., und Voet, J.: Biochemistry. (1973) John Wiley & Sons, New York
- [11] Stryer, L.: Biochemie. (1987) Vieweg & Sohn, Braunschweig
- [12] Löffler, G., und Petrides, P.E.: Biochemie und Pathobiochemie. (1997) Springer, Heidelberg
- [13] Lehninger, A. L.: Biochemie. (1987) VCH, Weinheim
- [14] Schwartz, A., Wang, L., Early, E., Gaigalas, A.K., Zhang, Y., Marti, G.E., and Vogt, R.F.: Quantitating Fluorescence Intensity from Fluorophore: The Definition of MESF Assignment. J. Res. Natl. Inst. Stand. Technol. **107**, (2002) S. 83–91
- [15] Dost, F.: Grundlagen der Pharmakokinetik. (1968) G. Thieme, Stuttgart
- [16] Weller, M.G.: Strukturelle und kinetische Untersuchungen zur Entwicklung und Optimierung von Hapten-Enzym-immunoassays (ELISAs) am Beispiel der Bestimmung von Triazinherbiziden. Dissertation. (1992) Technische Universität München
- [17] Bisswanger, H.: Enzymkinetik – Theorie & Methoden. (1994) VCH, Weinheim

Validierung eines „Fluorescent Enzyme Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA)

Jan Voigt¹, Bernd Ebert¹, Angelika Hoffmann² und Rainer Macdonald³

Zusammenfassung

Immunologische Verfahren haben während der vergangenen Jahrzehnte eine große Verbreitung in der Medizin gefunden. Grundlage dieser Verfahren ist die spezifische Bindung zwischen Antigenen und Antikörper. Eine der wichtigsten Methoden zum sensitiven und quantitativen Nachweis biologisch relevanter Moleküle ist hierbei der Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA).

Unter dem Aspekt der zahlreichen Einsatzgebiete ist die Frage nach Messunsicherheiten bei der Konzentrationsbestimmung von Biomolekülen mittels ELISA aus metrologischer Sicht von großem Interesse. Eine erhebliche Herausforderung stellt hierbei die Vielzahl von Einflussgrößen dar, die zudem hinsichtlich ihrer Messunsicherheit nur schwer zu quantifizieren sind. In Hinblick auf den Einsatz der Assays im Bereich der Laboratoriumsmedizin besteht die Notwendigkeit, Genauigkeit und Zuverlässigkeit dieser Messverfahren zu validieren. Zu diesem Zwecke wurden im Rahmen einer CCQM-Studie (CCQM- *Comité consultatif pour la quantité de matière – métrologie en chimie*) internationale Vergleichsmessungen an einem ELISA zur Zytokinbestimmung (humanes Interferon- α) durchgeführt [1], an denen sich die PTB beteiligt hat.

1 Einleitung

Mit der Entwicklung der Biotechnologie haben immunologische Verfahren in den letzten Jahrzehnten wichtige Fortschritte in der Medizin ermöglicht. Wegen der zentralen Rolle des Immunsystems bei einer Vielzahl von Erkrankungen ist die Immunologie für Prävention, Diagnostik und Therapie von Krankheiten von großer Bedeutung. Eines der wichtigsten Nachweisverfahren hierbei ist der ELISA, der seit seiner Einführung vor mehr als 30 Jahren eine weite Verbreitung gefunden hat.

Grundlage des ELISA, wie aller immunologischen Verfahren ist die spezifische Bindung zwischen Antigen (AG) und Antikörper (AK), wobei ein Antigen-Antikörper-Komplex gebil-

det wird. An der Bildung des Komplexes sind intermolekulare Bindungskräfte beteiligt.

Diese spezifische AG und AK Bindung erlaubt einen quantitativen Nachweis des Analyten (dies können Moleküle unterschiedlicher Molekularmassen, Antikörper, oder bei speziellen Techniken auch ganze Zellen sein) auch in komplexen Medien, wie z. B. Blut oder anderen Körperflüssigkeiten, aber auch in Gewässerproben. Die Bestimmung von Analyten ohne Aufreinigungsschritte bedeutet für viele Anwendungen einen großen Vorteil.

Generelle Vorteile des ELISA sind vor allem die hohe Sensitivität (Konzentrationen < 1 pg/ml) und die Spezifität des Nachweises, wobei der ELISA im Gegensatz zu ähnlich empfindlichen Radioimmunoassays jedoch ohne radioaktive Markierung auskommt [2]. Bei Assays mit radioaktiver Markierung ist nicht nur die geringe radioaktive Belastung und die daraus resultierende emotionale Voreingenommenheit von Nachteil, sondern auch die kurzen Halbwertszeiten der üblicherweise zur Markierung verwendeten Isotope (z. B. ^{125}I) oder auch die relativ hohen Kosten für Ausstattung und Verbrauchsmaterialien.

Der ELISA bietet auch die Möglichkeit der parallelen Prozessierung mehrerer Proben, die einen hohen Durchsatz erlaubt.

Ein wesentliches Merkmal beim ELISA ist die Fixierung des ausgebildeten AG-AK-Komplexes an einer Oberfläche eines Festkörpers wie etwa der Wandung der Kavität einer Mikrotiterplatte (Bild 1).

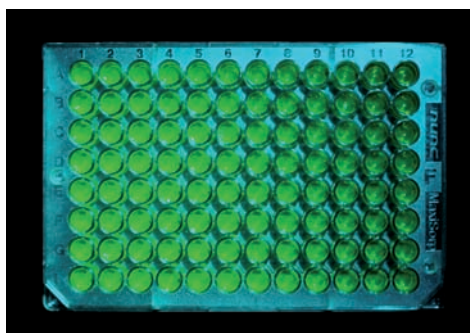


Bild 1: Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten

¹ Jan Voigt, Dr. Bernd Ebert, Arbeitsgruppe „Molekulare Bildgebung“
E-Mail: jan.voigt@ptb.de

² Angelika Hoffmann, Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung, Arbeitsgruppe „Fluoreszenzspektroskopie“, Berlin

³ Prof. Dr. Rainer Macdonald, Leiter des Fachbereichs „Bio-medizinische Optik“

Beispiele für verschiedene Designs von Assays sind in Bild 2 dargestellt [2]. Je nach Art des verwendeten Tests sind hierbei (s. Bild 2) Antigene (rot) oder Antikörper (dunkelblau bzw. dunkelgrün) an der Oberfläche gekoppelt. Der Antikörpernachweis erfolgt über die Detektion der Reaktionsprodukte einer enzymatisch katalysierten Reaktion (Enzym- hellgrün). Hierbei können Substrate zum Einsatz kommen, bei denen z. B. durch Farbumschlag eine Absorptionsänderung erfolgt. Alternativ kann das Substrat durch die Reaktion auch von einer nicht-fluoreszierenden in eine fluoreszierende Form überführt werden. Aus den Messsignalen der einzelnen befüllten Kavitäten wird dann bei quantitativen Tests anhand einer mitprozessierten Verdünnungsreihe des Analyten die Konzentration ermittelt.

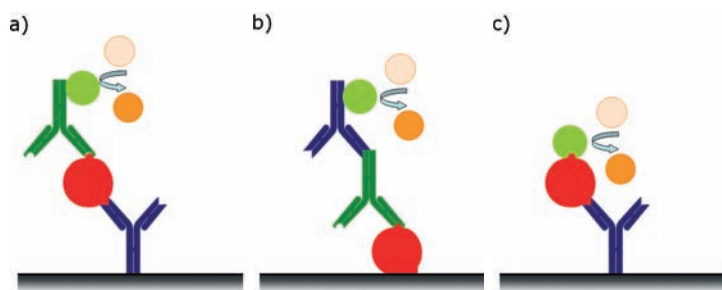


Bild 2:
gebräuchliche ELISA-Designs:
a) Sandwich-ELISA,
b) indirekter ELISA,
c) kompetitiver ELISA

Voraussetzung für einen Sandwich-ELISA ist, dass ein multivalenter Analyt nachzuweisen ist; kleine Moleküle mit geringem Molekulargewicht weisen meist nur eine Bindungsstelle auf, wodurch sie nicht mit einem Sandwich-Assay nachgewiesen werden können. Prinzipiell ist auch eine enzymatische Verstärkung des Messsignals denkbar, indem das Produkt der ersten Enzymreaktion katalytisch auf ein weiteres Enzymsystem einwirkt, aber nicht direkt detektiert wird.

Bedingt durch die z. T. hohe Anzahl verschiedener Reaktionsschritte bei der Durchführung eines ELISAs sind zahlreiche Einflußgrößen als Quellen von Messunsicherheiten zu berücksichtigen: Die endliche Genauigkeit des Flüssigkeitstransfers, nicht genau zu bestimmende Variationen der Reaktionsbedingungen und schließlich auch die Messunsicherheit bei der Detektion, ungeachtet dessen, ob die Absorption oder die Fluoreszenzintensität bestimmt wird. Hinzu kommt, dass oft ein „Kanteneffekt“ beobachtet wird, das heißt die Messunsicherheiten für die Konzentrationsbestimmung in den äußeren, an den Kanten der Platte gelegenen Kavitäten sind größer als die in den inneren Kavitäten.

Trotz der weiten Verbreitung der ELISA sind nur wenige Arbeiten zu finden, die die systematische Untersuchung von Einflussgrößen und die Bestimmung der Messunsicherheiten zum Inhalt haben [3, 4, 5, 6, 7]. Aus diesem Grunde wurde im Auftrag des CCQM eine Pilotstudie zu dieser Thematik durch das NPL (*National Physical Laboratory* – UK) und NIST (*National Institute of Standards and Technology* – USA) organisiert, an der 12 Einrichtungen (darunter Nationale Metrologie-Institute aus 8 Ländern) teilnahmen. Im Rahmen dieser CCQM - Pilotstudie wurden die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Untersuchungen an der PTB durchgeführt.

2 Material und Methoden

In Laboratorien werden ELISA routinemäßig mit so genannten Platerreadern ausgewertet. An der PTB wurde für die Vergleichsmessungen ein bildgebendes Labor-Messsystem eingesetzt. Der Aufbau bestand aus einem durch einen frequenzverdreifachten Nd:YAG-Laser gepumpten OPO (optisch parametrischer Oszillator) als in der Wellenlänge durchstimmbare Lichtquelle und einer intensivierten CCD-Kamera (ICCD-Kamera) zur Detektion. Vor dem Objektiv der Kamera wurden zwei optische Langpassfilter ($\lambda_{50\%} > 500 \text{ nm}$) zur Unterdrückung des Anregungslichtes angeordnet (s. Bild 3). Bei Darstellung der Fluoreszenz waren in der Regel Inhomogenitäten in der detektierten Intensität innerhalb der Kavitäten zu erkennen. Als stabiles Maß für die Intensität erwies sich hier das 80ste-Perzentil. In Bild 4 ist die Auswertung mittels Perzentilen veranschaulicht.

Um die Einflüsse verschiedener Faktoren auf die Messgröße trennen zu können, wurden die Untersuchungen in zwei Phasen durchgeführt.

In Phase 1 der Studie wurden Messungen an Lösungen eines Referenzmaterials (Fluorescein, NIST, SRM 1932) durchgeführt. Um den Messbereich und die Nachweisgrenze der physikalischen Messsysteme zu ermitteln, wurde eine Verdünnungsreihe einer SRM1932-Lösung mit Stoffmengenkonzentrationen von 1 pM bis 1 µM, in drei Schritten je Größenordnung hergestellt (s. Tabelle 1).

Zur Untersuchung der beim Pipettieren entstehenden Variation des Fluoreszenznachweises wurden mit gleicher Menge befüllte Platten (200 µl, 100 nM SRM1932-Lösung), in zwei Positionen, die sich durch eine Drehung um 180° unterscheiden, vermessen.

In Phase 2 der Studie wurden Messungen an einem nichtkompetitiven Sandwich-ELISA zur Bestimmung von humanem Interferon-α durchgeführt. Die Einzelschritte zu diesem ELISA sind in Bild 5 dargestellt. Der Nachweis erfolgte hierbei über die Detektion der Fluoreszenz von Fluorescein. Die Belegung der Plattenkavitäten zeigt Bild 6.

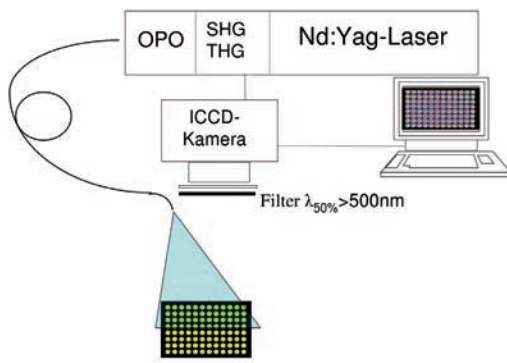


Bild 3: Schema des Messaufbaus

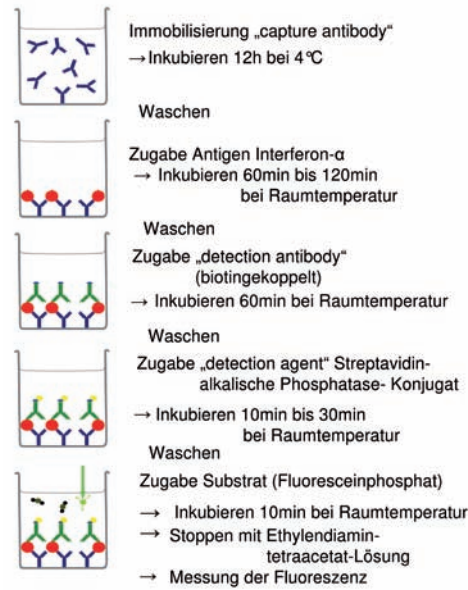


Bild 5: Arbeitsschritte beim verwendeten ELISA

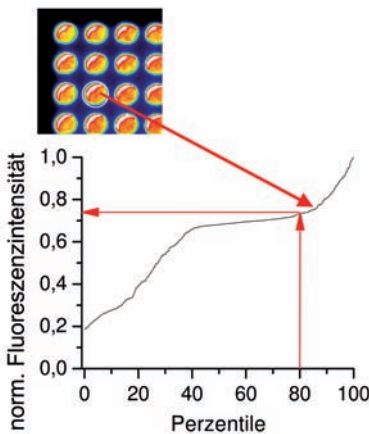


Bild 4: Auswertung der Intensitäten in den ROIs mittels Perzentilen

bekannte Konzentrationen zur Kalibration

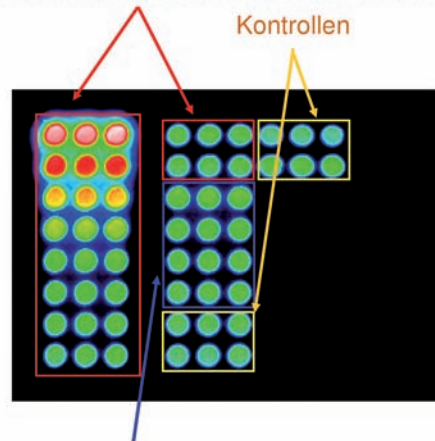


Bild 6: Belegungsschema der Platten in Phase 2

Tabelle 1: Belegung der Platte mit entsprechend verdünnter Fluoresceinlösung in den Reihen von A bis H

Spalte auf Platte	Fluorescein-konzentration
1	3,3 µM
2	1 µM
3	330 nM
4	100 nM
5	33 nM
6	10 nM
7	3 nM
8	1 nM
9	330 pM
10	100 pM
11	33 pM
12	0 nM

3 Ergebnisse

Phase 1 – Messungen unter Verwendung von SRM1932-Lösungen

Die zur Ermittlung des Messbereiches durchgeführten Messungen sind in Bild 7 dargestellt. Aus der Konzentrationsreihe wurde eine lineare Funktion nach der Methode kleinster Quadrate bestimmt. Der Messbereich wurde so definiert, dass bei dieser Anpassung der Korrelationsko-

effizient $R^2 > 99,95\%$ beträgt und die geringste Konzentration mindestens der Nachweisgrenze entspricht. Die Intensität bei der kleinsten nachweisbaren Konzentration soll mindestens so groß sein wie die Summe aus der Intensität der Pufferlösung und dem 3-fachen der Messunsicherheit dieser Intensität. Unter Berücksichtigung dieser Anforderungen konnte der Messbereich zu 33 pM bis 3,3 µM SRM1932-Lösung bestimmt werden, bei einer unteren Nachweisgrenze von 33 pM SRM 1932 (s. Bild 7)

Aus den in Bild 8 dargestellten Messungen lässt sich für die gesamte Platte eine Streuung von 2,5% ermitteln. Dieser Wert schließt die durch das Pipettieren verursachte Variabilität mit ein.

Um die durch das Pipettieren bedingte Variabilität separat zu ermitteln, wurde die Platte um 180° gedreht und erneut vermessen. Die Abweichungen zwischen Intensitäten der einzelnen Kavitäten bei beiden Positionen wurden nach Gleichung (1) bestimmt.

$$\Delta I_{rel} = \frac{I(x,y) - I(x',y')}{I(x,y)} \quad (1)$$

Bild 7: Abhängigkeit der auf einen Standard normierten gemessenen Fluoreszenzintensität von der vorgegebenen SRM 1932-Konzentration. Der Doppelpfeil kennzeichnet den ermittelten Messbereich.

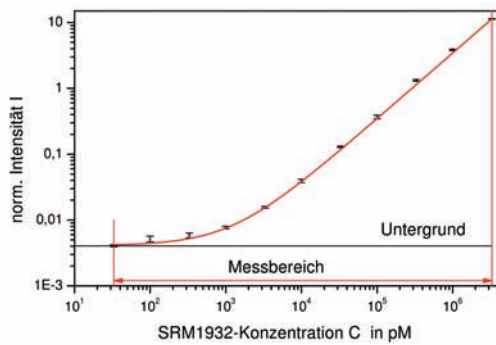


Bild 8: Falschfarbendarstellung der Abweichungen der Intensitäten bei einer 96-Kavitäten-Platte mit je 200 µl einer 100 nM Fluoresceinlösung

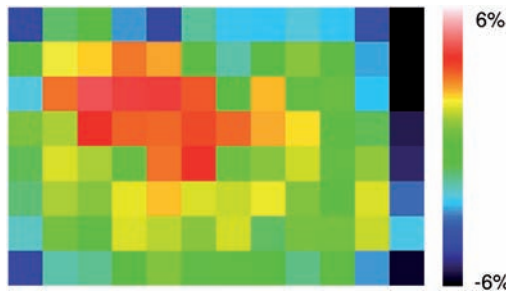


Bild 9: Falschfarbendarstellung der relativen Abweichungen der ermittelten Fluoreszenzintensitäten bei Drehung der Platte um 180°

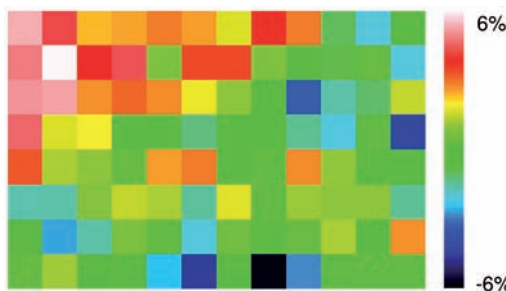


Bild 10: Aus Bild 9 mittels Medianfilter (3x3) errechnete relative systematische Abweichungen in Falschfarbendarstellung



Hier ergab sich für die relative Standardabweichung ein Wert von 1,6 % (siehe Bild 9).

Eine systematische Abweichung der Detektion, z. B. bedingt durch eine inhomogene Ausleuchtung, kann durch eine 2D-Glättung sichtbar gemacht werden, da individuelle Abweichungen der Messwerte ausgeglichen werden. Die so ermittelte relative Standardabweichung betrug etwa 1%.

Vergleicht man die Intensitäten der im Randbereich befindlichen Kavitäten mit denen der inneren Kavitäten (siehe Bild 8), so kann man Abweichungen hinsichtlich der detektierten Intensitäten erkennen. Durch den Vergleich einer äußeren mit einer benachbarten inneren Zeile ergibt sich im Mann-Whitney-U-Test der Intensitäten der randständigen und der zentralen

Kavitäten für den Test auf zwei unabhängige Gruppen ein Wert von $p < 0,05$; somit ist ein Kanteneffekt signifikant.

Phase 2 – ELISA-Messungen zur Interferon- α -Bestimmung

In der zweiten Phase der Pilotstudie sollten die Messunsicherheiten bei der Bestimmung der Konzentration von humanem Interferon- α anhand eines nichtkompetitiven Sandwich-ELISA ermittelt werden. Hierbei sind sowohl Variabilitäten bei der Prozessierung des ELISA als auch bei der Anpassung der Modellfunktion zu berücksichtigen, die insgesamt zur Messunsicherheit beitragen.

Bei der Auswertung wurde eine sigmoide Funktion (II) zur Beschreibung der Konzentrationsabhängigkeit der gemessenen Fluoreszenzintensität benutzt [7, 8].

$$I = \frac{(A - D)}{\left(1 + \left(\frac{C}{C_0}\right)^B\right)} + D \tag{II}$$

Hierbei stellt A die obere und D die untere Asymptote, C_0 den Wendepunkt sowie B ein Maß für die Steigung im Wendepunkt dar (siehe Bild 11).

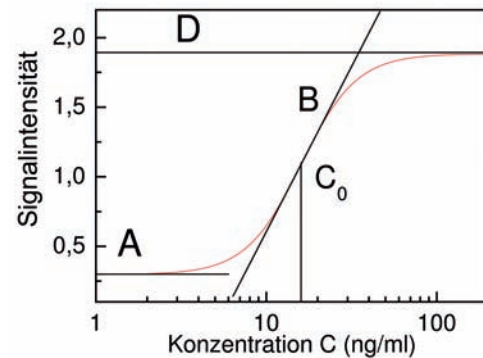


Bild 11: Beispiel einer 4-parametrischen sigmoiden Funktion

Diese Modellfunktion wurde aus den Proben der Verdünnungsreihe ermittelt, die parallel mit den zu bestimmenden Proben auf der gleichen Mikrotiterplatte prozessiert wurden. Hierzu wurde eine nichtlineare mehrparametrische Ausgleichsrechnung anhand von je drei Proben bei zehn verschiedenen IFN- α -Konzentrationen (insgesamt also 30 Werten) durchgeführt.

Die für das gezeigte Beispiel rechnerisch ermittelten Parameter sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

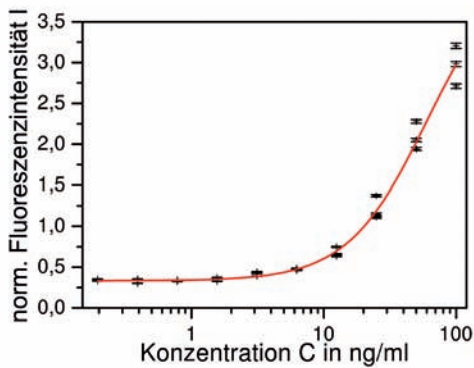


Bild 12: Auftragung der normierten Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit von der Interferonkonzentration in halblogarithmischer Darstellung. Fit durch sigmoide Funktion (II)

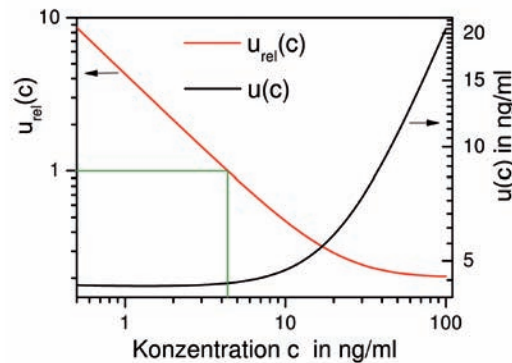


Bild 13: Darstellung der Messunsicherheiten $u(C)$ und der relativen Messunsicherheiten $u_{rel}(C)$ in Abhängigkeit von der Konzentration C

Tabelle 2: Durch Ausgleichsrechnung ermittelte Parameter

Parameter	Wert	Unsicherheit
A	0,332	0,008
B	1,4	0,1
C_0 (ng/ml)	60,5	12,5
D	4,3	0,6

Aus diesen Parametern und unter der Annahme einer Variabilität der Detektion I von 1,6% (siehe Phase 1) lässt sich die Messunsicherheit nach Umstellung der Gleichung (II) zu

$$C = C_0 \cdot B \cdot \sqrt{\frac{A - D}{I - D}} - 1 \tag{III}$$

schätzen aus

$$u(C) = \sqrt{\left(\frac{\partial C}{\partial I} u(I)\right)^2 + \left(\frac{\partial C}{\partial A} u(A)\right)^2 + \left(\frac{\partial C}{\partial B} u(B)\right)^2 + \left(\frac{\partial C}{\partial C_0} u(C_0)\right)^2 + \left(\frac{\partial C}{\partial D} u(D)\right)^2} \tag{IV}$$

In Bild 13 ist sowohl die Messunsicherheit u als auch die relative Messunsicherheit u_{rel} als Funktion der Interferon-Konzentration C unter Berücksichtigung der Unsicherheiten der Parameter A , B , C_0 und D sowie der Intensität I dargestellt. Durch die grünen Linien ist die Konzentration gekennzeichnet, bei der C gleich der Messunsicherheit $u(C)$ wird bzw. $u_{rel}(C) = 1$ ist. Im betrachteten Konzentrationsbereich ist eine starke Änderung der Messunsicherheit in Abhängigkeit von der Konzentration zu erkennen. Daraus folgt, dass die Konzentration des Analyten an den Assay angepasst sein sollte, so dass die Konzentration im Bereich der kleinsten Messunsicherheiten bestimmt werden kann. Gegebenfalls muss hierzu eine Verdünnungsreihe der Probe untersucht werden. Des Weiteren sollte die Kalibrationsreihe sowohl die untere als

auch die obere Asymptote umfassen, so dass das Modell mit möglichst geringen Unsicherheiten bei der Bestimmung der Parameter angewendet werden kann. Diese Forderungen konnten bei dem vorliegenden Studienprotokoll allerdings nicht erfüllt werden.

4 Schlussfolgerung

Es wurden systematische Untersuchungen zur Abgrenzung und Quantifizierung von Einflussgrößen, die zu Messunsicherheiten führen vorgenommen. Die von der Fluoreszenzdetektion herrührende Variabilität der verwendeten bildgebenden Messanordnung beträgt 1,6 % und liegt damit in einem Bereich, den auch kommerzielle Platereader im Rahmen der Studie erreichten. Zusätzlich ermöglicht diese Anordnung bei einer homogenen Ausleuchtung eine Analyse der Verteilung der Fluoreszenzintensität innerhalb einer Kavität, bzw. die Analyse des Übersprechens zwischen benachbarten Kavitäten. Die durch die gleichzeitige Erfassung aller Kavitäten der Platte deutlich höhere Zeitauflösung, erlaubt die Messung der Kinetik des Substratumsatzes in das fluoreszierende Produkt. Generell ist allerdings festzustellen, dass die wesentlichen, die Messunsicherheit bestimmenden Einflussgrößen durch die biochemischen Abläufe und nur zu einem geringen Teil durch die Fluoreszenzdetektion bestimmt werden. Die Modellierung der Wirkung der Einflussgrößen auf die Messunsicherheit ist derzeit noch nicht abgeschlossen. In dieser Arbeit wurde von Unsicherheiten, mit denen das Modell entsprechend der Ausgleichsrechnung behaftet ist, ausgegangen. Als Aufgabe bleibt, ein Modell für die Messunsicherheit zu etablieren, das es erlaubt weitere Einflussgrößen, wie zum Beispiel Volumina und Konzentrationen von AK- und AG-Lösungen bzw. die Bindungsfähigkeit von Antikörpern oder unspezifische Bindung von AK bzw. AG an der Oberfläche der Mikrotiterplatte zu berücksichtigen.

5 Danksagung

Die Autoren danken C. Elster und G. Wübber für die hilfreiche Diskussion bezüglich der Messunsicherheit.

6 Literatur

- [1] J.E. Noble, L. Wang, E. Cerasoli, A.E. Knight, R.A. Porter, E. Gray, C. Howe, E. Hannes, P. Corbisier, J. Wang, L. Wu, I. Alteri, M. Patriarca, A. Hoffman, U. Resch-Genger, B. Ebert, J. Voigt, Y. Shigeri, M. Vonsky, L. Konopelko, A. K. Gaigalas, M.J.A. Bailey: An international comparability study to determine the sources of uncertainty associated with a non-competitive sandwich fluorescent ELISA. *J. of clinical chemistry & laboratory medicine*, Vol. 46, No. 7/2008, S. 1033–1045
- [2] D.M. Kemeny, S.J. Challacombe: ELISA and other solid phase immunoassays. J. Wiley&Sons, 1988
- [3] Y. Hayashi, R. Matsuda, T. Maitani, K. Imai, W. Nishimura, K. Ito, M. Maeda: Precision. Limit of detection and range of quantitation in competitive ELISA. *Anal. Chem.* Vol. 76, (2004), Seiten 1295–1301
- [4] D.H. Choi, Y. Katakura, R. Matsuda, Y. Hayashi, K. Nimomiya, S. Shioya: Simulation Model for Predicting Limit of Detection and Range of Quantitation of Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J. of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 103, Nr. 5, (2007), S. 427–431
- [5] G. Jones, M. Wortberg, S.B. Kreissig, B.D. Hammock, D.M. Rocke: Sources of experimental variation in calibration curves for enzyme-linked immunosorbent assay. *Analytica Chimica Acta*, Vol. 313, 05 (1995), S. 197–207
- [6] D.S. Daly, A.M. White, S.M. Varnum, K.K. Anderson, R.C. Zangar: Evaluating concentration estimation errors in ELISA microarray experiments. *BMC Bioinformatics*, 26.01.2005
- [7] D. Rodbard: Statistical Quality Control and Routine Data Processing for Radioimmunoassays and Immunoradiometric Assays, *Clin. Chem.* Vol 20, Nr. 10, (1974), S. 1255–1270
- [8] J.S. Garden, D.G. Mitchell, W.N. Mills: Non-constant variance regression techniques for calibration-curve-based analysis, *Anal. Chem.* Vol. 52, (1980), S. 2310–2315

Mikroskopisches Messverfahren für nanometrische Abstandsmessungen an einzelnen Makromolekülen unter nativen Bedingungen

Steffen Rüttinger¹, Benedikt Krämer², Martin Roos³

1 Einleitung

Bereits 1944 verwies Erwin Schrödinger in seinem Buch „Was ist Leben“ auf die fundamentalen Unterschiede zwischen Systemen, die die klassische Physik studiert und biologischen Organismen. Anders als in stark geordneten Systemen wie z. B. Atomen oder Kristallen, bei denen aus der Eigenschaft des Ensembles auf die Eigenschaft eines Ihrer Bestandteile geschlossen werden kann, sind entsprechende statistische Aussagen zu einfach für komplexe lebende Systeme. Beispielsweise können verschiedene Kopien eines Proteins oder DNS Stranges nebeneinander in verschiedenen, kurzlebigen, gefalteten Zuständen existieren. Messungen an einem Ensemble zur Strukturanalyse würden nur einen Durchschnitt ergeben, jedoch nicht eine einzige der wahren und für ihre Funktion essentiellen Struktur offenlegen.

Seither wurden viele Fortschritte erzielt und heute gilt die wichtige Hypothese, dass durch Identifizierung und Quantifizierung geeigneter Parameter das Verständnis von biologischen Systemen verbessert werden kann. Der Zustand einer Zelle kann zum Beispiel mit der Anzahl oder der Konformation (gefaltet oder nicht gefaltet) eines bestimmten Proteins verknüpft sein. Die Messaufgabe würde dann darin bestehen, dieses Protein zu quantifizieren oder dessen Konformation zu bestimmen. Der Zustand der Zelle kann also durch geeignete Einheiten, wie zum Beispiel die Anzahl des ausgewählten (und sich in einem speziellen Zustand befindlichen) Proteins ausgedrückt werden. Als fundamentale Einheit bietet sich in solchen und ähnlichen Fällen also ein einzelnes Molekül geradezu an.

Hierfür sind Methoden und Messverfahren zum Nachweis und zur Detektion einzelner Moleküle erforderlich, deren grundsätzlicher Vorteil bereits angedeutet wurde: ihre inhärente Möglichkeit quantitative Ergebnisse zu erzielen. In biologischen Systemen sind einzelne Moleküle (z. B. Proteine aber auch DNS) die kleinsten funktionellen Einheiten, gleichzeitig können diese kleinsten Einheiten vollständig die Funktion und Entwicklung eines biologischen

Systems bestimmen (z. B. kann ein DNS Molekül alle für eine Zelle notwendigen Informationen kodieren).

In diesem Artikel wird eine ausgewählte und an der PTB weiterentwickelte Einzelmolekülmethode, nämlich die Abstandsmessung mittels resonantem Förster Energietransfer (Förster Resonant Energy Transfer – FRET) vorgestellt. Mittels FRET lassen sich inter- und intra-molekulare Abstände in der Größenordnung von wenigen Nanometern unter nativen Bedingungen messen. Dies lässt sich ausnutzen, um Kollokalisierungen von Molekülen aber auch Faltungszustände von Proteinen nachzuweisen. Von besonderem Interesse ist dabei unter metrologischen Gesichtspunkten eine Evaluierung der Genauigkeit und der Grenzen dieser Methode auf Einzelmolekülniveau.

2 Experimenteller Aufbau

Für die Einzelmolekül FRET Untersuchungen wurde ein konfokales Laser Scanning Mikroskop eingesetzt. Damit wird ein laterales Auflösungsvermögen am Abbeschen Beugungslimit (ca. 0,3 μm) erreicht und im Unterschied zu gewöhnlichen Durchlichtmikroskopen auch eine Detektionsselektivität in Richtung der optischen Achse. Es lassen sich somit auch dreidimensionale Strukturen auflösen, vor allem ist aber das Beobachtungsvolumen sehr klein (etwa 1 fl). Ein kleines Beobachtungsvolumen ist essentiell für ein gutes Signal zu Rauschverhältnis, da das Signal, welches von einem einzelnen Molekül gemessen werden kann, begrenzt ist. Das Signal zu Rausch Verhältnis kann also nur durch Reduktion des Untergrundes aus dem Detektionsvolumen (hervorgerufen z. B. durch Raman Streuung an Wassermolekülen), in dem sich das zu untersuchende Molekül befindet, d. h. durch Verringerung dieses Volumens verbessert werden.

Als praktische Meßgröße wird die Anzahl der von einem Fluoreszenzmarker nach entsprechender Anregung ausgesandten Fluoreszenzphotonen erfasst. Durch die Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen kann eine hohe Selektivität erreicht werden.

¹ Steffen Rüttinger, Arbeitsgruppe „Durchflusszytometrie und Mikroskopie“ E-Mail: steffen.ruettinger@ptb.de

² Benedikt Krämer, PicoQuant GmbH, Berlin

³ Martin Roos, Robert-Koch-Institut, Berlin

Für die FRET Abstandsmessung wurden Polyprolin Moleküle bekannter Länge verwendet, die an den Enden mit zwei Farbstoffen markiert waren, welche bei unterschiedlichen Wellenlängen angeregt werden können und welche auch spektral unterscheidbar fluoreszieren. Für die Abstandsmessung nutzt man den Effekt des resonanten Energie transfers zwischen beiden Farbstoffen aus, der mit der sechsten Potenz des Abstands beider Marker abnimmt. Ganz konkret bedeutet dies, dass man den Marker mit der kürzeren Fluoreszenzwellenlänge (Donor genannt – hier im grünen Spektralbereich) anregt, anschließend aber die Emission des längerwelligeren Markers (Akzeptor genannt - hier im roten Spektralbereich) detektiert. Es ist dabei wichtig, dass der Akzeptor nicht direkt mit dem Anregungslicht des Donors anregbar ist, die Fluoreszenz desselben also nur durch den abstandsabhängigen Energieübertrag zwischen Donor und Akzeptor verursacht wird. Die Energieübertragungseffizienz E lässt sich wie folgt aus den Fluoreszenzintensitäten von Donor (F_D) und Akzeptor (F_A) errechnen:

$$E = \frac{F_A}{F_A + F_D}$$

Woraus sich der Abstand der beiden Fluorophore R wie folgt ergibt:

$$R = \sqrt[6]{\frac{1-E}{E}} R_0$$

Dabei ist R_0 eine für das FRET Paar spezifische Konstante, die den Abstand markiert bei der die Übertragungseffizienz 50% ist.

Bild 1 zeigt schematisch den Versuchsaufbau. Als Anregungsquellen werden gepulste Laserdioden (Pulsdauer etwa 300 ps) verwendet, die abwechselnd (mit einer Wiederholfrequenz von jeweils 40 MHz) emittieren. Das Anregungslicht wird über einen dichroitischen Filter und ein Mikroskopobjektiv in die Probe fokussiert. Die dort angeregten Fluoreszenzphotonen werden z.T. vom selben Mikroskopobjektiv eingesammelt, passieren den dichroitischen Filter und werden von der Tubuslinse auf die konfokale Lochblende abgebildet. Diese Lochblende können nur Photonen passieren, die aus der fokalen Ebene des Mikroskops stammen. Photonen, die Ihren Ursprung außerhalb des Fokusses haben, werden durch die Lochblende weitestgehend ausgeblendet. Die Detektion der Fluoreszenzphotonen erfolgt durch sogenannte Avalanche Photodioden, welche im Geiger Modus betrieben werden und Photonen - Detektionseffizienzen von bis zu 70 % erreichen. Die spektrale Trennung der vom Donor und Akzeptor emittierten Photonen erfolgt mit Bandpassfiltern, welche nur für den

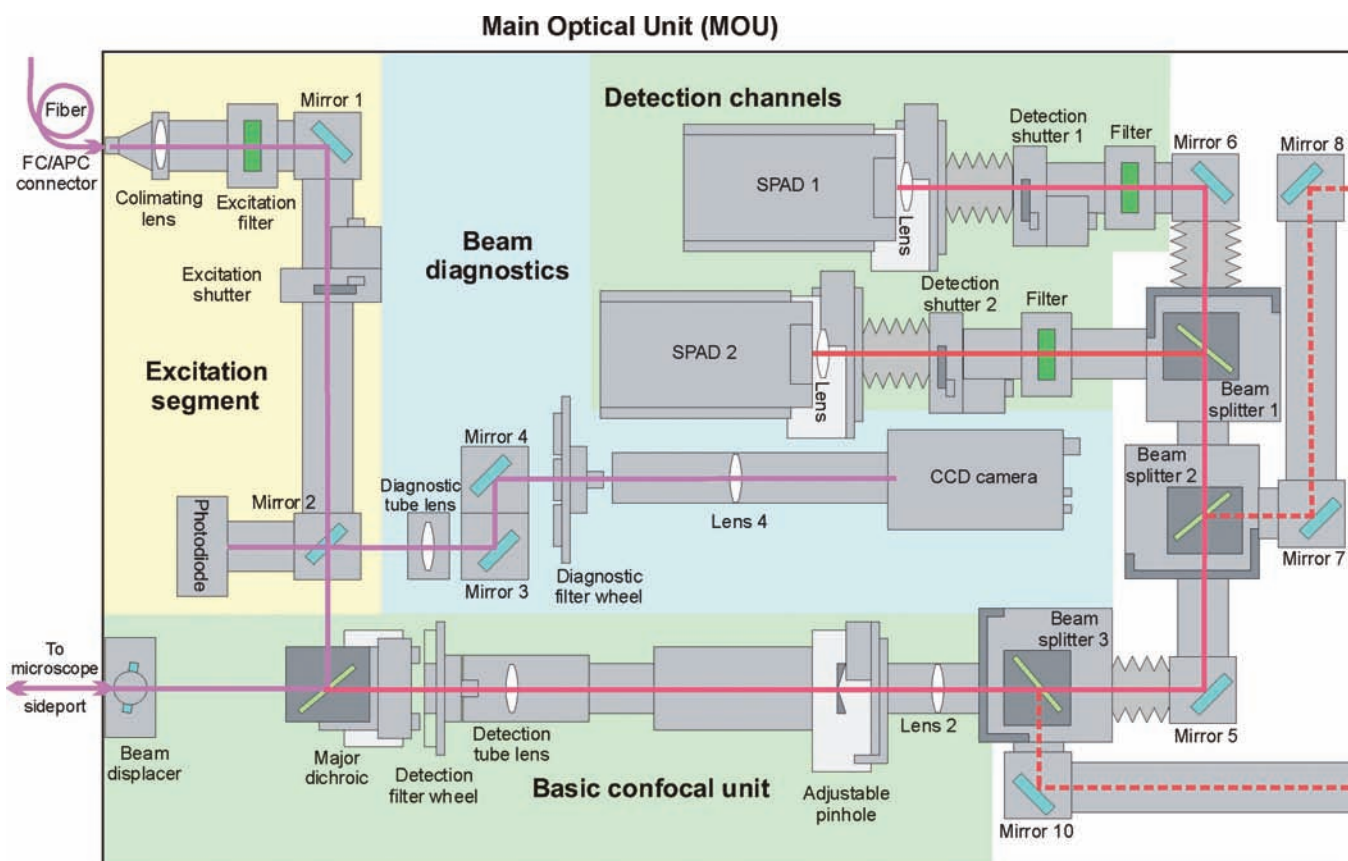


Bild 1:
Schematischer Aufbau des verwendeten konfokalen Mikroskops (MT 200, PicoQuant GmbH, Berlin)

jeweiligen Spektralbereich durchlässig sind. Somit ist Detektor 1 nur für Photonen welche vom Donor emittiert wurden empfindlich, während Detektor 2 nur Photonen detektiert, welche vom Akzeptor emittiert wurden.

3 Ergebnis

Bild 2 zeigt die molekulare Struktur der untersuchten Proben. Zur Kalibrierung und Evaluierung der Genauigkeit der Methode wurden vier verschiedene lange Polyprolinmoleküle verwendet, da bei diesen Molekülen die Länge durch verschiedene Messungen als bekannt vorausgesetzt werden konnte. Beide Enden wurden am Robert Koch Institut mit einem Donor und Akzeptor Fluorophor markiert.

Für die Messungen wurden stark verdünnte wässrige Lösungen der oben genannten Moleküle hergestellt. Die starke Verdünnung (im picomolaren Bereich) gewährleistet, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit immer nur ein einziges Molekül gleichzeitig durch das Beobachtungsvolumen diffundiert, jedes Molekül also individuell vermessen werden kann.

Bei der Messung werden die Photonen gezählt, die jeweils von Akzeptor und Donor jedes einzelnen Moleküls emittiert werden. Aus dem Verhältnis der Photonenzahlen wird dann die Effizienz des Energieübertrages errechnet. Um Artefakte durch unvollständig markierte Moleküle zu vermeiden, wird jedoch nicht nur der Donor angeregt, um anschließend die Emission des Donors und des Akzeptors zu messen, sondern abwechselnd (im Abstand von 12,5 ns) erst der Donor und dann der Akzeptor. Nur Moleküle, bei denen nach Anregung des Akzeptors auch dessen Fluoreszenz registriert wurde, werden für die weitere Analyse berücksichtigt. Dies garantiert, dass Moleküle, die keinen Akzeptor haben nicht in die Analyse einfließen. Im konkreten Experiment verfährt man also folgendermaßen. Ein Laserpuls im grünen Spektralbereich ($\lambda_{\text{exc}}=532 \text{ nm}$) regt den Donor an, dessen Anregungsenergie wird nun entweder durch Fluoreszenz ($\lambda_{\text{em}}=568 \text{ nm}$) abgegeben oder durch resonanten Energieübertrag auf den Akzeptor übertragen, welcher dadurch in den angeregten Zustand übergeht und anschließend selbst rotes Licht ($\lambda_{\text{em}}=670 \text{ nm}$) emittiert. Aus dem Verhältnis von roten und grünen Photonen kann die Effizienz des Energieübertrages errechnet werden. Dies geschieht aber nur wenn direkt im Anschluss (12,5 ns später) mittels direkter Anregung des Akzeptors dessen Existenz bestätigt wird. Zu bemerken gibt es dabei noch, dass sich ein Molekül im Mittel etwa 0,5 ms im Detektionsvolumen aufhält (die Aufenthaltszeit ist definiert durch die Diffusionsgeschwindigkeit der Moleküle). Jedes Molekül wird also mehrere tausend Mal vermessen.

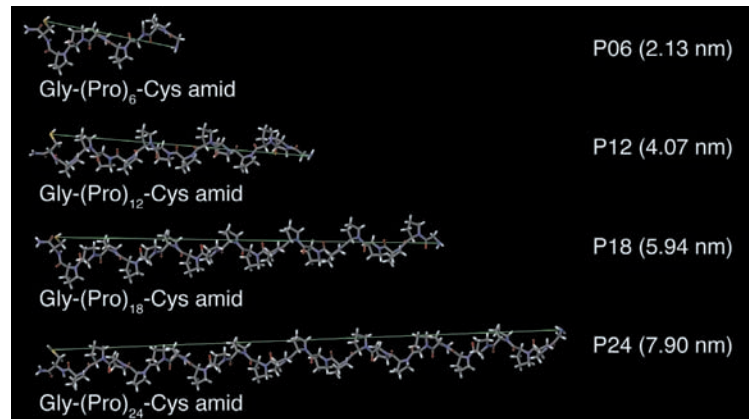


Bild 2: Molekulare Struktur der verwendeten Polyprolinmoleküle

Die gemessenen Energieübertragungseffizienzen werden anschließend für viele Moleküle in einem Histogramm erfasst (Bild 3). Deutlich sichtbar ist die Abnahme der Energieübertragungseffizienz mit zunehmender Moleküllänge. Die Breite der Verteilung im Histogramm ist durch die Photonenstatistik gegeben und kein Indikator für Schwankungen der Moleküllänge. Die Breite nimmt mit zunehmender Länge der Moleküle zu, was durch unterschiedliche Detek-

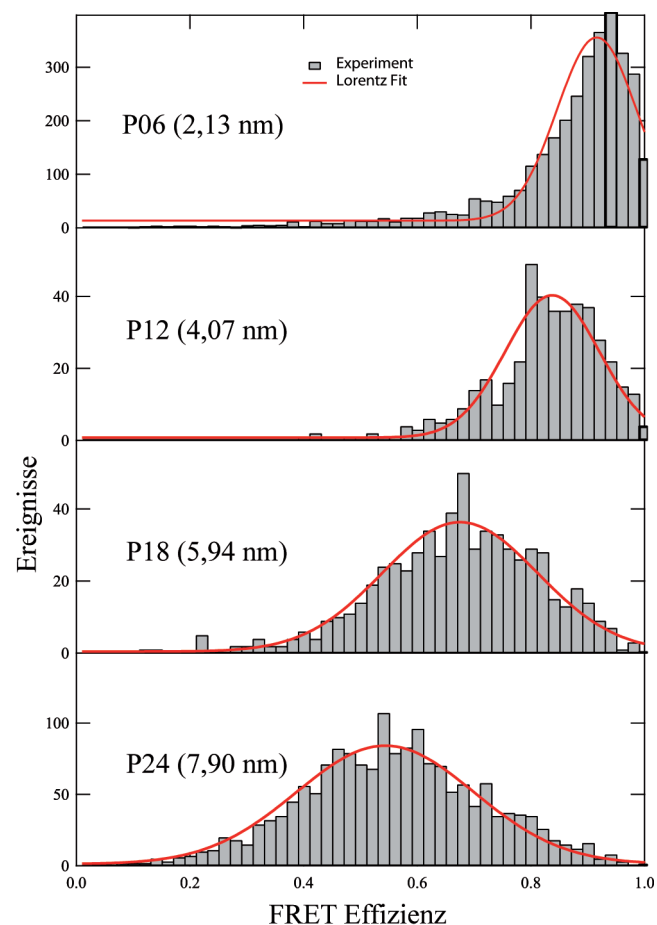


Bild 3: Histogramm der FRET Effizienzen für verschieden lange Polyprolin Moleküle

tionseffizienzen für Donor und Akzeptor verursacht wird. Gleichzeitig wird hierdurch deutlich, dass die Genauigkeit der Methode durch die limitierte Anzahl der Fluoreszenzphotonen, die pro Molekül detektiert werden kann, begrenzt ist. Diese Grenze kann jedoch durch Histogrammierung von möglichst vielen einzelnen Molekülen verschoben werden. Man kann nun einwenden, dass es sich somit effektiv wieder um eine Ensemble Messung handelt. Der Vorteil der Messung von einzelnen Molekülen und der Auswertung vieler einzelner Messungen in einem Histogramm gegenüber einer einzelnen Messung an vielen Molekülen besteht aber darin, verschiedene Populationen unterscheiden zu können. Dieser Vorteil wird deutlich, wenn man auch die Moleküle in die Auswertung mit einbezieht, die keinen Akzeptor haben. Diese erscheinen dann im Histogramm als zusätzliche Population. Anhand einer Ensemble Messung wäre diese Populationen nicht aufzulösen und würde nur einen durchschnittlichen (und falschen) Wert für die Energieübertragungseffizienz und somit für die Länge der Moleküle ergeben. In diesem einfachen, hier demonstrierten Fall ermöglicht die Verwendung von Einzelmolekülmessungen also die Vermeidung systematischer Fehler, welche bei Ensemble Messungen unvermeidlich zu einer Verfälschung des Ergebnisses führen würden.

Bild 4 zeigt die gemessenen Energieübertragungseffizienzen in Abhängigkeit von der Länge der verwendeten Polyprolinmoleküle. Dabei stellt die gestrichelte schwarze Kurve den aus der einfachen Förstertheorie erwarteten Zusammenhang dar. Die gemessenen Werte (rote Vierecke) lassen sich allerdings erst durch die Berücksichtigung verschiedener experimenteller Einflüsse wie z. B. unzureichende spektrale Trennung erklären. Es wurde eine Methode zur Quantifizierung dieser experimentellen Einflüsse

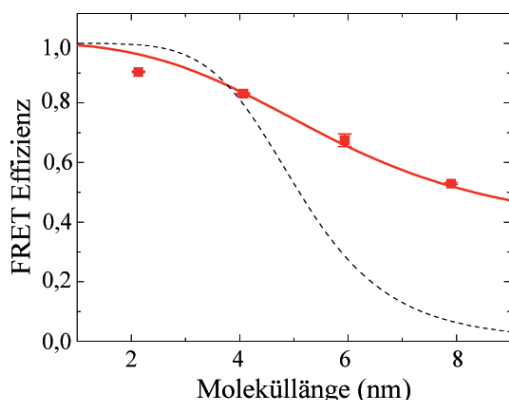


Bild 4: Abstandsabhängigkeit der FRET Effizienz. Rote Quadrate stellen Messwerte dar, die gestrichelte Kurve ist der nach der einfachen Förstertheorie erwartete Zusammenhang, während für die rote Kurve die experimentellen Gegebenheiten mit berücksichtigt wurden.

entwickelt, welche zur Korrektur der theoretisch erwarteten Abhängigkeit benutzt werden kann. Das Ergebnis ist die in Bild 4 dargestellte rote Kurve. Man beachte, dass es sich dabei nicht um eine Kurvenanpassung der Messwerte handelt, sondern um eine Erweiterung der einfachen Förstertheorie, welche nun die experimentellen Gegebenheiten berücksichtigt. Als zusätzliche Parameter fließen dabei unter anderem mittels Fluoreszenz Korrelations Spektroskopie gemessene unterschiedliche Anregungs- und Detektionseffizienzen der Donor und Akzeptormoleküle ein. Weiterführende und detailliertere Erläuterungen des verwendeten Verfahrens können in [1] und [2] nachgelesen werden.

4 Zusammenfassung

Abstandsmessungen auf Einzelmolekülniveau sind für das Verständnis von biologischen Systemen von großer Wichtigkeit, quantitativ aber schwer zu realisieren, da Messergebnisse leicht durch unvollständig markierte Moleküle und experimentelle Unzulänglichkeiten wie unzureichende spektrale Trennung der verwendeten Fluoreszenzmarker verfälscht werden. Wir haben ein Meß- und Auswerteverfahren entwickelt, welches es ermöglicht, zwischen vollständig und unvollständig markierten Molekülen zu unterscheiden und systematische experimentelle Fehler zu quantifizieren und somit zu korrigieren. Die in Bild 4 dargestellte rote Kurve kann als Kalibrationskurve verwendet werden, um andere biologisch interessante Moleküle zu vermessen. Die dabei zu erwartenden Messunsicherheiten liegen im Bereich von 0,5 nm bis 1 nm (abhängig von der Länge des Moleküls). Als erstes Molekül wurde das für den Infektionsweg des HB-Virus entscheidende Molekül TLM untersucht und seine Länge zu $(3,7 \pm 0,5)$ nm bestimmt. Mit der gewonnenen Längenangabe lässt sich mit Hilfe von Simulationsrechnungen voraussagen, dass das Molekül in der α -helikalen Form vorliegt.

5 Literatur

- [1] S. Rüttinger, B. Krämer, M. Roos, R. Macdonald, F. Koberling, and E. Hildt: Accurate single-pair Förster resonant energy transfer through combination of pulsed interleaved excitation, time correlated single-photon counting, and fluorescence correlation spectroscopy. *Journal of Biomedical Optics*, 11(2):024012, 2006.
- [2] S. Rüttinger: Confocal Microscopy and Quantitative Single Molecule Techniques for Metrology in Molecular Medicine. PhD thesis, TU-Berlin, October 2006.

Fluoreszenzgestützte molekulare Bildgebung *in vivo*

Bernd Ebert¹, Kai Licha²

Zusammenfassung

Die molekulare Bildgebung repräsentiert ein modernes Forschungsgebiet, das die Aufklärung des Ablaufs molekularer biologischer Prozesse mit Hilfe geeigneter Sonden und dessen Visualisierung *in vivo* ermöglicht. Diese Technik der Bildgebung kann – abgesehen von der Injektion von Kontrastmitteln – als nicht-invasiv bezeichnet werden. Um ein möglichst genaues Abbild der Prozesse auf zellulärer Ebene *in vivo* zu erhalten, dürfen Einflüsse der verwendeten Sonden auf die biologischen Prozesse nicht zu groß sein. Als ein wesentlicher Bestandteil der molekularen Bildgebung können Kontrastmittel zum Verständnis molekularer Prozesse und zur Entwicklung maßgeschneiderter Diagnostika und Therapeutika beitragen. An der PTB werden seit mehr als 15 Jahren optische bildgebende Systeme entwickelt und zum Nachweis der Fluoreszenz in Gewebephantomen, Kleintiermodellen und zur Lokalisation von Tumoren und ihren Vorstufen sowie zum frühen Nachweis entzündlicher Prozesse im klinischen Bereich eingesetzt. Zelluläre Veränderungen treten bei vielen Erkrankungen auf, daher kann die molekulare Bildgebung auch bei der frühen Diagnose chronisch-entzündlicher Erkrankungen eine bedeutende Rolle spielen. Dazu können Fluoreszenzfarbstoffe als sowohl unspezifische als auch spezifische Kontrastmittel, die eine höhere Nachweisempfindlichkeit versprechen, eingesetzt werden.

1 Einleitung

Bildgebende Verfahren ohne radioaktive Belastung, wie die Magnetresonanztomographie, die Ultraschallbildgebung und die nahinfrarot (NIR) Bildgebung, weisen unterschiedliche räumliche Auflösung und Sensitivität auf und werden neben den nuklearmedizinischen Methoden wie Positronen-Emissions-Tomographie (PET) und Single Photon Emission Computed Tomographie (SPECT) entwickelt, um zusätzlich zur Darstellung der Morphologie auch funktionelle Vorgänge in Zellen sichtbar zu machen [1–3]. Eine bei der Diagnose von Krankheiten

wesentliche Herausforderung ist die exakte Lokalisation einer Läsion mit krankhaftem molekularem Expressionsprofil im Körper. Daher wird insbesondere an der Entwicklung Kontrastmittel-gestützter optischer und Magnetresonanztomographie (MRT) Verfahren gearbeitet, um genauere Aussagen über die diagnostizierten Läsionen treffen zu können. Ungeachtet der Vorteile der MRT bereiten die hohen Kosten und die geringe physikalische Nachweisempfindlichkeit der MRT bei der Verwendung von Kontrastmitteln Probleme. Darum werden derzeit beispielsweise verstärkt empfindliche optische Methoden entwickelt, um das Problem zumindest in oberflächennahen Bereichen lösen zu können. Eine Methode ist die sogenannte Nah-Infrarot (NIR)-Bildgebung, bei der für das menschliche Auge unsichtbares Licht des nah-infraroten Spektralbereichs bis zu einigen Zentimetern tief in biologisches Gewebe eindringen kann. Die Untersuchung der Streuung und Absorption des eingestrahnten Lichtes im Gewebe sowie die Fluoreszenz geeigneter Kontrastmittel gestatten Aussagen zur Morphologie und zu funktionellen Eigenschaften. An der PTB wurden weltweit die ersten Systeme zur zeitaufgelösten Fluoreszenzbildgebung an Kleintieren [4–7] entwickelt. Erprobung, Optimierung und Einsatz der Fluoreszenzmesstechnik erfolgten in enger Zusammenarbeit mit dem Institut für Diagnostikforschung (IDF) und später mit der Schering AG, Berlin, wobei durch die Partner neue Kontrastmittel und Tiermodelle bereitgestellt wurden.

Wie bei Untersuchungen von Tumorerkrankungen und Entzündungen, wie der rheumatoiden Arthritis, erfolgreich demonstriert wurde, können Fluoreszenzfarbstoffe als parenteral applizierbare Kontrastmittel die diagnostische Aussagekraft der optischen Bildgebung verbessern. Dabei haben je nach Anwendung sowohl unspezifische Kontrastmittel (Farbstoffe mit einem Profil ähnlich den MRT Kontrastmitteln), als auch molekulare Proben (Farbstoffkonjugate mit zielspezifischen Biomolekülen) ihre Leistungsfähigkeit unter Beweis gestellt [8, 9].

¹ Dr. Bernd Ebert, Arbeitsgruppe „Gewebeoptik und molekulare Bildgebung“
E-Mail: bernd.ebert@ptb.de

² Dr. Kai Licha, mivenion GmbH, Berlin,

In der vorliegenden Arbeit wird insbesondere das Potential der optischen Bildgebung für die molekulare Bildgebung anhand eigener Ergebnisse und Literaturdaten diskutiert.

2 Methoden der molekularen Bildgebung

Eine Zusammenfassung und qualitative Bewertung der häufig für die molekulare Bildgebung eingesetzten Verfahren ist in Bild. 1 dargestellt. Der Ultraschall wurde nicht mit einbezogen, da diese Methode bisher in geringerem Maße zur Lösung molekularer Fragestellungen herangezogen wurde. Wegen ihres hohen räumlichen Auflösungsvermögens sind derzeit die Computertomografie (CT) und die Magnetresonanztomografie (MRT) die maßgeblichen Verfahren zur Darstellung der Morphologie. Mit diesen morphologischen Verfahren werden z. B. PET oder SPECT kombiniert, die im wesentlichen Stoffwechselfvorgänge und molekulare Vorgänge sichtbar machen. Hierzu zählen auch optische Verfahren, die den Nachweis von Farbstoffen mit annähernd ähnlicher Empfindlichkeit wie den Nachweis von radioaktiven Tracern gestatten. Die MRT und optische Verfahren haben als Vorteil gemeinsam, den Patienten nicht mit radioaktiver Strahlung zu belasten. Insgesamt ergänzen sich die aufgezählten Verfahren sehr gut, teilweise können sogar die gleichen Liganden mit methodenspezifischen signalgebenden Molekülen gekoppelt werden.

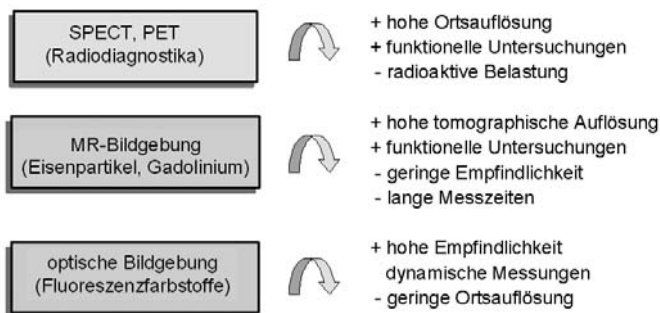


Bild 1:
In der molekularen Bildgebung häufig eingesetzte Methoden

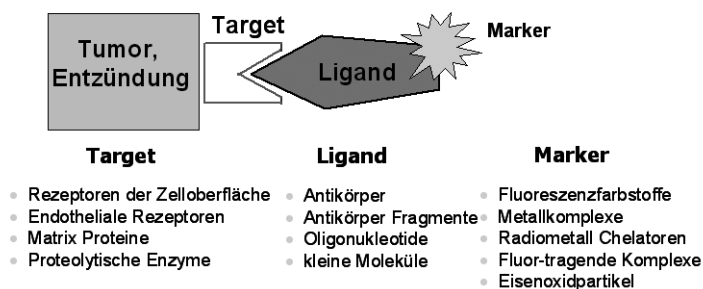


Bild 2:
Aufbau und Funktion spezifischer Sonden

Als Liganden können beispielsweise Antikörper oder deren Fragmente, einfache Peptidsequenzen oder Oligonukleotide (z. B. Aptamere) dienen. Diese Liganden sind spezifisch für molekulare Marker bestimmter Krankheiten. Nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip binden sie mit hoher Selektivität an die entsprechenden Bindungspartner im kranken Gewebe und bewirken so eine Anreicherung der an sie gebundenen signalgebenden Moleküle. Der Aufbau und die Funktionsweise von Signalmolekülen ist in Bild. 2 erläutert.

3 Fluoreszenzmessungen *in vivo*

Voraussetzung für die Erzielung einer hohen Nachweisempfindlichkeit nach intravenöser Gabe von Fluoreszenzfarbstoffen ist eine möglichst untergrundfreie Messung der Kontrastmittelfluoreszenz. Prinzipiell besitzt Gewebe eine Eigenfluoreszenz, die im Spektralbereich des Nahinfrarotlichts vergleichsweise gering ist. Um den nahrungsbedingten Autofluoreszenzuntergrund im NIR-Spektralbereich noch weiter zu senken, wurde die Fluoreszenz verschiedener Sorten von Tierfutter untersucht. Dabei ergab sich, dass die manganfreie Diät (ssniff R/M-H, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Germany) nahezu keine Fluoreszenzemission im Spektralbereich $\lambda > 740$ nm aufweist. Die Tiere wurden ca. 10 Tage vor den Fluoreszenzuntersuchungen mit dieser Diät versorgt [10]. Vor jeder Messung werden die optischen Kontrastmittel intravenös verabreicht. Für jede Messung werden die Tiere anästhesiert.

Ein Messplatz zur Aufnahme von Fluoreszenzbildern ist in Bild 3 dargestellt. Für die Anregung der Fluoreszenz wird gepulstes (3 ns) Laserlicht (Infinity, Coherent Dieburg, Deutschland) in eine Quarz-Faser eingekoppelt, deren Ausgang neben dem Objektiv zur nahezu senkrechten Beleuchtung angeordnet wird. Für den Nachweis werden zwei Langpass-Filter $\lambda_{50\%} = 800$ nm (OD 10) zum Blocken des reflektierten Anregungslichtes und eine intensivierete CCD-Kamera (Roper Scientific) mit einem 35 mm Objektiv, Apertur $f / 1,4$ (Nikon) zur Aufzeichnung verwendet. Da die Fluoreszenzabklingzeiten der häufig eingesetzten NIR-Farbstoffe im Subnanosekunden Bereich liegen, kann die verwendete Nachweisteknik nicht zur Trennung der spezifischen Fluoreszenz von der Gewebeeigenfluoreszenz anhand unterschiedlicher Fluoreszenzabklingzeiten genutzt werden. Der Vorteil der „gegateten“ Messtechnik bei einer Wiederholrate von 100 Hz und einer Öffnungszeit von 20 ns besteht darin, dass der Anteil des Umgebungslichtes effektiv unterdrückt werden kann. Das ist z. B. eine wesentliche Voraussetzung für simultane Fluoreszenz- und Weißlichtmessungen in einem Endoskop [11].

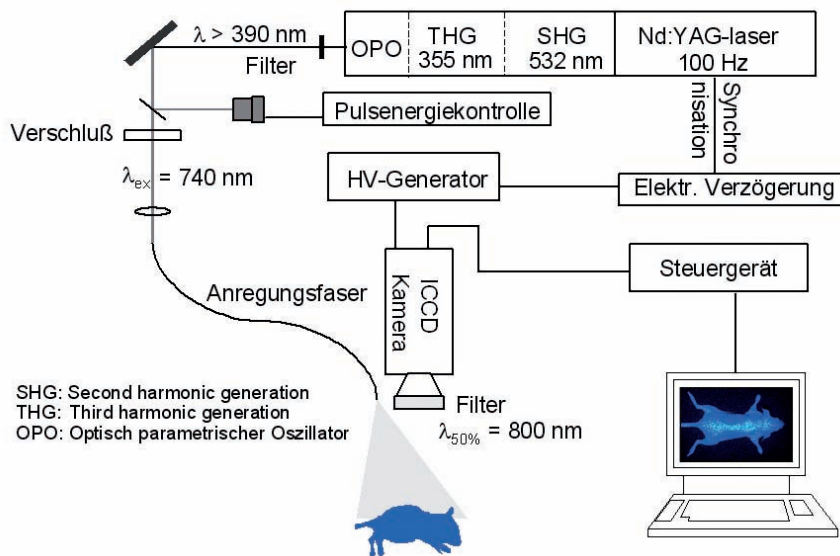


Bild 3:
 Aufbau eines Messplatzes zur zeitaufgelösten (3 ns)
 Messung von Fluoreszenzbildern.

Zur Erfassung des dynamischen Verhaltens der als Bolus injizierten Kontrastmittel werden vor und nach der Applikation eines Farbstoffs in ein Tumor-tragendes Tier Fluoreszenzbilder in definierten zeitlichen Abständen aufgenommen. Je nach Spezifität der Sonde kann sich die Zeit für die Erfassung von Fluoreszenzbildern bis zu 48 Stunden erstrecken. Die Tiere werden dazu auf einer schwarzen nicht-fluoreszierenden Unterlage positioniert.

Die Fluoreszenzemission kann unter in vivo Bedingungen nicht absolut bestimmt werden. Zu den Parametern, die die gemessene Fluoreszenzintensität bestimmen, gehören die Oberflächengeometrie, die Absorptions- und Streueigenschaften des Gewebes, die von der Umgebung abhängige Quantenausbeute des Farbstoffs, die Tiefe der Fluorophore im Gewebe usw. Da diese Parameter nicht alle anhand einer Messung exakt bestimmt werden können, wird die Fluoreszenzintensität normiert, um eine Vergleichbarkeit der Tiere untereinander zu ermöglichen. Zu diesem Zweck wurde fluoreszierendes Phantommateriale entwickelt, das in seinen Streu- und Absorptionseigenschaften dem biologischen Gewebe angepasst ist [12].

Bei allen Fluoreszenzaufnahmen wird der elektronische Untergrund korrigiert und die Laserleistung entweder direkt über die gemessene Pulsenergie (s. Bild 3) oder mit Hilfe eines stabilen fluoreszierenden Streukörpers korrigiert. Da selbst mit einer mehrfach stark gebogenen Faser (Ausfüllung des Modenprofils!) keine vollkommen homogene Ausleuchtung des Aufnahmegebietes erzielt werden kann, werden Bilder einer homogenen Fläche zur Korrektur der Ausleuchtung aufgenommen und anschließend mit dem Tierbild verrechnet.

4 Datenauswertung

Die Fluoreszenzbilder werden auf einer Festplatte gespeichert und mit kommerzieller Software (WinView, Roper Scientific) vorausgewertet. Für die Bildauswertung mit mehreren regions of interest (ROIs) wurde ein eigenes Programm in Visual Basic 6.0 entwickelt [D. Petzelt, PTB]. Dabei werden die Tumorregion und kontralateral gelegenes Gewebe als gleichgroße ROIs ausgewählt und entweder der Mittelwert oder Percentile bestimmt. In gleicher Weise wird mit Hilfe eines ROIs die Fluoreszenzintensität einer Referenz bestimmt und zur Korrektur benutzt [13].

5 Referenzmaterialien

Fluoreszierende feste Referenzmaterialien, die an den zu untersuchenden Spektralbereich angepasst sind, können in der Regel nicht käuflich erworben werden. Die im NIR-Spektralbereich häufig eingesetzten niedermolekularen Cyaninfarbstoffe mussten deshalb erst geeignet immobilisiert werden. Zu diesem Zweck wurden Cyaninfarbstoffe an kleine Quarzkugeln gekoppelt (s. Bild 4). Durch die Steuerung des Beladungsgrades und die Immobilisierung der

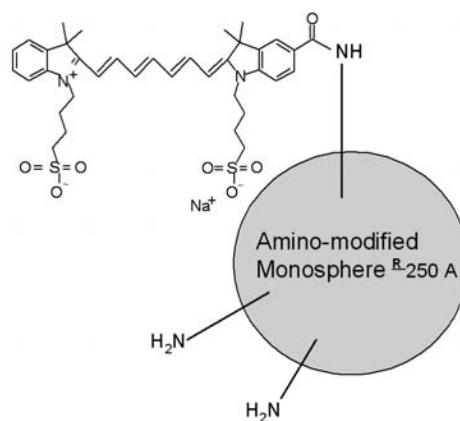


Bild4:
 Schema der kovalent
 an mit Aminogruppen
 modifizierten kleinen
 Glaskugeln gebundenen
 Cyaninfarbstoffe.

Kugeln in einem Harz wird eine Aggregation oder eine Diffusion der Farbstoffe zueinander verhindert und damit sichergestellt, dass keine Auslöschung der Fluoreszenz auftritt. Das resultierende Material vereint somit eine Kombination gewünschter Streu-, Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften im Spektralbereich der zu untersuchenden Kontrastmittel. Es hat sich in zahlreichen Studien als stabiles Referenzmaterial bewährt.

Bild 5 zeigt das Fluoreszenzbild des Referenzmaterials in Falschfarben. An einen kleinen Würfel, der aus Polymermaterial [12] mit eingebettetem Referenzmaterial besteht, wurde zur besseren Handhabung das gleiche Polymermaterial angeklebt. Die Umrisse des Quaders sind weiß markiert. Die Fluoreszenzintensitätsprofile über den Quader sind in zwei Projektionen

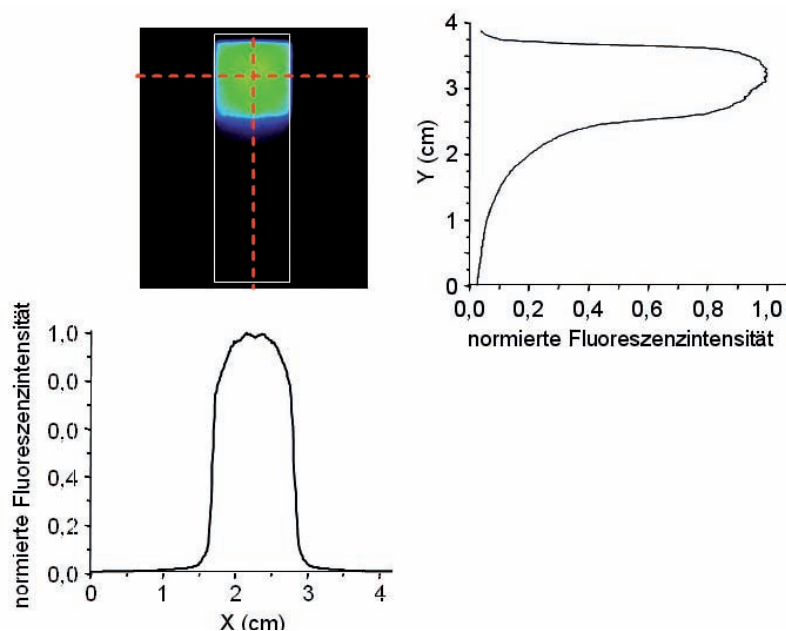


Bild 5: Fluoreszenzabbildung eines streuenden Quaders mit fluoreszierendem Würfel in Falschfarben. Die darunter und rechts gezeigten Kurven stellen die normierten Intensitätsverteilungen der Fluoreszenzphotonen dar.

dargestellt. Die in Richtung der Längsachse gezeigte Intensitätsverteilung weist sehr deutlich auf die Streuung der Fluoreszenzphotonen im Polymermaterial ohne Farbstoff hin.

Eine weitere Möglichkeit zur Korrektur und Kontrastverbesserung bei Transilluminationsmessungen ist z. B. durch die Normierung des Fluoreszenzbildes auf das Absorptionsbild des Farbstoffes gegeben [14].

6 Spezifische Markierung

Spezifische Kontrastmittel werden zurzeit im wesentlichen an Tiermodellen studiert. Bei einer spezifischen Kontrastmittelanreicherung

können z. B. die Lymphknoten einer Maus sehr gut dargestellt werden [15]. Die abgebildeten Lymphknoten sind nur Millimeter groß, erscheinen jedoch durch die Streuung des Fluoreszenzlichtes im Gewebe in Abhängigkeit von der Tiefe wesentlich größer (s. Bild 6). Unter bestimmten Umständen, d. h. in Abhängigkeit von der Lage der Läsion, kann die Anreicherung der Farbstoffe in anderen Bereichen des Körpers, wie in der Leber (s. Bild 6), im Gastrointestinaltrakt oder in der Blase zu Schwierigkeiten bei der Auswertung der Fluoreszenzbilder führen.

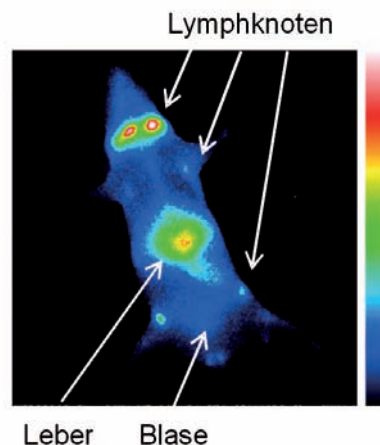


Bild 6: Optische Bildgebung von Lymphknoten unter Verwendung eines vaskulären Kontrastmittels [14]. Die Darstellung zeigt eine Aufnahme 24 Stunden nach Injektion des Kontrastmittels (1 mg/kg Körpergewicht). Die Fluoreszenzintensität ist in Falschfarben dargestellt, wobei die Farbe Weiß der höchsten Fluoreszenzintensität entspricht.

Die Erfassung von 2D-Fluoreszenzabbildungen in Reflexionsanordnung lässt nur bei Läsionen die direkt unter der Haut liegen relative Aussagen zur Konzentration des Kontrastmittels zu. Um tieferliegende Läsionen richtig erfassen zu können, sind Information zur räumlichen Anordnung erforderlich. In der Literatur werden zwei grundsätzlich unterschiedliche Wege zur Lösung dieses Problems besprochen. Zum einen wird versucht durch die Aufnahme verschiedener Projektionen in Transmissionsanordnung und einer anschließenden 3D-Rekonstruktion die fluoreszierenden oder absorbierenden Zentren zuzuordnen [16, 17]. Der andere in unseren Untersuchungen beschrittene Weg besteht darin, dass durch die spektrale Trennung der anregenden von den Fluoreszenzphotonen in Reflexionsanordnung die Tiefe durch Laufzeitmessungen bestimmt werden kann [18]. Eine entsprechende Abhängigkeit der mittleren Flugzeit von der Tiefe eines fluoreszierenden Zylinders in einem streuenden (μ_s') und absorbierenden (μ_a) Medium ist in Bild 7 dargestellt. Die für das Phantom benutzten optischen Parameter μ_a und μ_s' entsprechen humanem Brustgewebe.

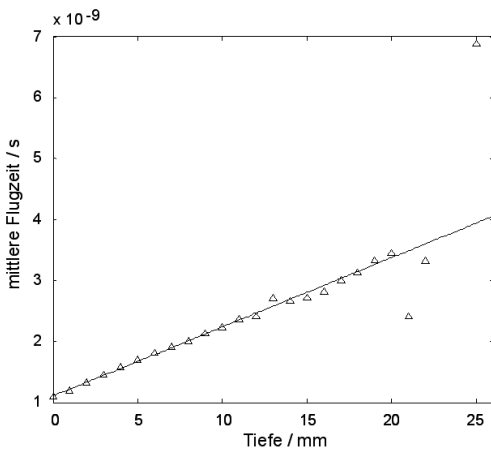


Bild 7: Darstellung der Zunahme der mittleren Flugzeit in Abhängigkeit von der Tiefe eines fluoreszierenden Zylinders in einem streuenden und absorbierenden Medium.

Bis zu einer Tiefe von 20 mm ergibt sich eine linearer Zusammenhang zwischen mittlerer Flugzeit und Tiefe der fluoreszierenden Inhomogenität. Die bei größeren Tiefen deutlich sichtbaren Streuungen der Werte sind durch das abnehmende Signal zu Rausch-Verhältnis bedingt. Unter der Annahme einer vergleichbaren Streuung im Gewebe und einer selektiven Anreicherung des Kontrastmittels in einem Tumor kann die Tiefenposition ermittelt werden.

Die bisher diskutierten Beispiele zeigen, dass optische Methoden vergleichsweise einfach und effizient für die Forschung mit Tiermodellen eingesetzt werden können. Daher ist die Optimierung von Leitstrukturen unter Einbezug von Fluoreszenzfarbstoffen eine interessante Option. In unserer Publikation (Bhargava et al. [19]) wurden Bibliotheken aus Peptiden, an die ein NIR-Farbstoff gekoppelt wurde, hergestellt. Mittels in vivo Bildgebung konnte schließlich eine erfolgreiche Optimierung der Peptidsequenz dadurch nachgewiesen werden, dass das Fluoreszenzsignal der entsprechenden Verbindung eine höhere Intensität aufwies als das des nativen Peptids (vasoactive intestinal peptide, VIP). Ein weiterer interessanter Aspekt dieser Optimierung war, dass sich auch die Kinetik des Fluoreszenzverlaufs nach intravenöser Gabe des Kontrastmittels im Tiermodell deutlich änderte. Das Maximum der Fluoreszenzintensität wurde bei der nativen Verbindung bereits nach 6 Minuten erreicht, bei der optimierten Substanz jedoch erst nach 30 Minuten, wodurch das Zeitfenster für empfindliche Messungen deutlich erweitert wird.

7 Ausblick

Der Weg des Einsatzes kontrastmittelgestützter optischer Bildgebungsmethoden im klinischen Bereich wird, ungeachtet der methodischen

Möglichkeiten und der Erfolge die der Einsatz spezifischer Kontrastmittel bietet, in naher Zukunft über unspezifische Kontrastmittel führen. Die so genannten extrazellulären „Bloodpool“ Kontrastmittel, die an Bestandteile des Bluts gebunden und nach kurzer Zeit wieder ausgeschieden werden, weisen häufig weniger Nebenwirkungen auf und sind gut herstellbar. Diese Vorteile sind auch für die klinische Zulassung wesentlich, da entsprechende Zulassungsverfahren zeitaufwendig und teuer sind. In Abhängigkeit von den biochemischen Eigenschaften der Kontrastmittel ergeben sich durchaus unterschiedliche methodische Anforderungen an die Bildgebungstechnik, was eine enge Zusammenarbeit zwischen Chemikern, Medizinern und Physikern bei der Entwicklung neuer Kontrastmittel und der entsprechenden Bildgebungsverfahren erfordert.

8 Literatur

- [1] McCarthy, J.R.; Weissleder, R.: Multifunctional magnetic nanoparticles for targeted imaging and therapy. *Adv Drug Deliv Rev.* **60(11)**, (2008), S. 1241–1251
- [2] Schuster, D.M.; Halkar, R.K.: Molecular imaging in breast cancer: *Radiol Clin North Am* **42(5)**, (2004), S. 885–908
- [3] Becker, A.; Riefke, B.; Ebert, B.; Sukowski, U.; Rinneberg, H.; Semmler, W.; Licha, K.: Macromolecular contrast agents for optical imaging of tumors: comparison of indotricarbocyanine-labeled human serum albumin and transferrin: *Photochem. Photobiol.* **72**, (2000), S. 234–241
- [4] Weissleder, R.; Mahmood, U.: Molecular Imaging. *Radiology* **219**, (2001), S. 316–333
- [5] Becker, A.; Hessenius, C.; Licha, K.; Ebert, B.; Sukowski, U.; Semmler, W.; Wiedenmann, B.; Grötzing, C.: Receptor-targeted optical imaging of tumors with near-infrared fluorescent ligands. *Nature Biotechnol.* **19**, (2001), S. 327–331
- [6] Rudin, M.; Weissleder, R.: Molecular imaging in drug discovery and development. *Nature Rev. Drug Discov.* **2**, (2003), S. 123–131.
- [7] Weissleder, R.; Pittet, M.J.: Imaging in the era of molecular oncology. *Nature.* **452**, (2008), S. 580–589
- [8] Fischer, T.; Gemeinhart, I.; Wagner, S.; Stieglitz, D.V.; Schnorr, J.; Hermann, K.G.; Ebert, B.; Petzelt, D.; Macdonald, R.; Licha, K.; Schirner, M.; Krenn, V.; Kamradt, T.; Taupitz, M.: Assessment of unspecific near-infrared dyes in laser-induced fluorescence imaging of experimental arthritis. *Acad Radiol.* **13(1)**, (2006), S. 4–13. Comment in: *Acad Radiol.* **13(1)**, (2006) S. 1–3

- [9] *Licha, K.; Olbrich, C.*: Optical imaging in drug discovery and diagnostic applications (review). *Adv Drug Deliv Reviews*. **57**, (2005), S. 1087–1108
- [10] *Riefke, B.; Licha, K.; Semmler, W.; Nolte D.; Ebert B.; Rinneberg, H.*: In vivo characterization of cyanine dyes as contrast agents for near-infrared imaging. *SPIE* **2927**, (1996), S. 199–208
- [11] *Ortner, M.A.; Ebert, B.; Hein, E.; Zumbusch, K.; Nolte, D.; Sukowski, U.; Weber-Eibel, J.; Fleige, B.; Dietel, M.; Stolte, M.; Oberhuber, G.; Porschen, R.; Klump, B.; Hörtnagl, H.; Lochs, H.; Rinneberg, H.*: Time gated fluorescence spectroscopy in Barrett's oesophagus. *Gut*. **52(1)**, (2003), S. 28–33
- [12] *Sukowski, U.; Schubert, F.; Grosenick, D.; Rinneberg, H.*: Preparation of solid phantoms with defined scattering and absorption properties for optical tomography. *Phys. Med. Biol.* **43**, (1996), S. 1823–1844
- [13] *Resch-Genger, U.; Hoffmann, K.; Nietfeld, W.; Engel, A.; Neukammer, J.; Nitschke, R.; Ebert, B.; Macdonald, R.*: How to Improve Quality Assurance in Fluorometry: Fluorescence-Inherent Sources of Error and Suited Fluorescence Standards. *J Fluoresc.* **15**, (2005), S. 337–362
- [14] *Ebert, B.; Sukowski, U.; Grosenick, D.; Wabnitz, H.; Moesta, K.T.; Licha, K.; Becker, A.; Semmler, W.; Schlag, P.M.; Rinneberg, H.*: Near-infrared fluorescent dyes for enhanced contrast in optical mammography: phantom experiments. *J Biomed Optics* **6**, (2001), S. 134–140
- [15] *Licha, K.; Debus, N.; Emig-Vollmer, S.; Hofmann, B.; Hasbach, M.; Stibenz, D.; Sydow, S.; Schirner, M.; Ebert, B.; Petzelt, D.; Bühner, C.; Semmler, W.; Tauber, R.*: Optical molecular imaging of lymph nodes using a targeted vascular contrast agent. *J Biomed Opt.* **10(4)**, (2005), S. 41205 (1–6)
- [16] *Culver, J.P.; Choe, R.; Holboke, M.J.; Zubkov, L.; Durduran, T.; Slem, A.; Ntziachristos, V.; Chance, B.; Yodh, A.G.*: Three-dimensional diffuse optical tomography in the parallel plane transmission geometry: evaluation of a hybrid frequency domain/continuous wave clinical system for breast imaging. *Med Phys.* **30(2)**, (2003), S. 235–247
- [17] *Soubret, A.; Ntziachristos, V.*: Fluorescence molecular tomography in the presence of background fluorescence. *Phys Med Biol.* **51(16)**, (2006), S. 3983–4001.
- [18] *Betz T.*: Dreidimensionale Lokalisation von fluoreszierenden Inhomogenitäten in gewebeähnlichen Phantomen mittels Piko-sekunden zeitaufgelöster Messung. Diplomarbeit, Remagen (2006) Mediennummer 0042566X
- [19] *Bhargava, S.; Licha, K.; Knaute, T.; Ebert, B.; Becker, A.; Grötzinger, C.; Hassenius, C.; Wiedenmann, B.; Schneider-Mergener, J.; Volkmer-Engert, R.*: A complete substitutional analysis of VIP for better tumor imaging properties. *J Mol Recognit.* A complete substitutional analysis of VIP for better tumor imaging properties. *J Mol Recognit* **15(3)**, (2002), 145–153

Quantifizierung biomolekularer Bindungen mit magnetischen Nanopartikeln als Sonden

Dietmar Eberbeck¹, Uwe Steinhoff¹, Lutz Trahms²

In der Labormedizin, in der Lebensmittelüberwachung und bei der Entwicklung neuer Arzneistoffe spielen hochsensitive molekularbiologische Nachweisverfahren heute eine herausragende Rolle. So ist zum Beispiel der Nachweis bestimmter Enzyme oder Proteine, so genannter Biomarker, im Blut eines Patienten eine wichtige Methode zur Erkennung einer Krebserkrankung oder eines Herzinfarkts. Neben der Primärdiagnostik werden biomolekulare Nachweisverfahren zunehmend auch bei der Steuerung und Überwachung therapeutischer Verfahren eingesetzt.

Eine wesentliche Anforderung an ein Nachweisverfahren ist eine hohe Sensitivität, d. h. der genaue Nachweis geringer Stoffmengen, bei gleichzeitig hoher Spezifität, so dass eine Beeinflussung der Messwerte durch andere Parameter als den der Konzentration des gesuchten Stoffes ausgeschlossen wird. Um diese hohe Spezifität beim Nachweis zu erreichen, werden häufig so genannte Immunoassays eingesetzt. In einem Immunoassay werden Antigen-Antikörper-Bindungsvorgänge ausgelöst und mittels geeigneter Methoden quantifiziert. Antikörper sind dabei Eiweiße, die im Immunsystem von Wirbeltieren ganz spezifisch als Reaktion auf das Vorhandensein eines bestimmten Fremdstoffes, eines Antigens, gebildet werden und nur an dieses anknüpfen.

Grundprinzip der Quantifizierung eines Antigens, des Analyten, in einer flüssigen Phase durch die Bindung an einen Antikörper ist die Markierung der Antikörper vor der Bindungsreaktion mit einem Signalgeber, der Sonde. Es existieren eine Reihe chemisch-physikalischer Prinzipien, mit denen diese molekularen Sonden Signale erzeugen können, die sich makroskopisch auslesen lassen. In den meisten Verfahren werden fluoreszierende Moleküle, radioaktive Elemente oder z. B. eine Farbreaktion hervorrufende Enzyme als Sonden verwendet. Eine weitere Möglichkeit der Quantifizierung eines Antigens ist mit der Oberflächenplasmonenresonanz durch die Änderung der optischen Eigenschaften einer dünnen Oberfläche durch den Bindungsvorgang gegeben.

Hier stellen wir ein weiteres Messverfahren vor, die Magnetrelaxometrie (MRX) [2], bei der als Sonden zur Quantifizierung magnetische Nanopartikel (MNP) verwendet werden. Bei der MRX wird das Abklingen der Magnetisierung einer Probe (auch die Relaxation der Magnetisierung genannt) nach Abschalten eines äußeren Aufmagnetisierungsfeldes mittels hochempfindlicher magnetischer SQUID-Sensoren (Superconducting Quantum Interference Device) gemessen. Die Feldstärke des Aufmagnetisierungsfeldes beträgt 2 mT, das ist etwa das 50fache des Erdmagnetfeldes. Die Relaxation der Magnetisierung der Probe wird im Intervall $450 \mu\text{s} < t < 500 \text{ ms}$ gemessen. Die gesamte Messung dauert etwa 3 s.

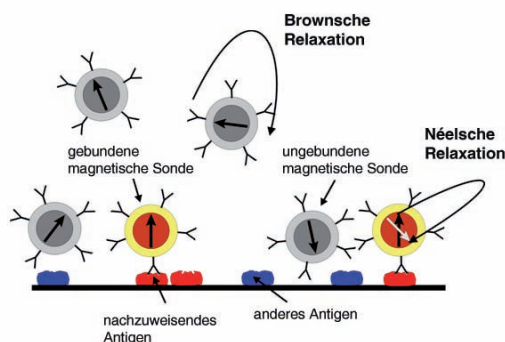


Bild 1: Schematische Darstellung eines magnetischen Festphasenimmunoassays auf der Basis der Relaxation der Momente magnetischer Nanopartikel (MNP). Während die Momente aller MNP, d. h. sowohl der gebundenen als auch der ungebundenen, innerhalb des magnetischen Kerns relaxieren, können die Momente der ungebundenen Sonden *zusätzlich* durch die Brownsche Bewegung der gesamten Sonden ihre Richtung ändern.

Die Nutzung magnetischer Nanopartikel als Sonden bietet gegenüber den anderen Messmethoden eine Reihe von Vorteilen:

- Die magnetischen Sonden werden im Unterschied zu vielen optischen Sonden durch die Messung nicht dauerhaft beeinflusst, so dass die Messungen beliebig oft wiederholt werden können.
- Die Magnetfelder der magnetischen Sonden werden von den biologischen Materialien in

¹ Dr. Dietmar Eberbeck, Dr. Uwe Steinhoff, Arbeitsgruppe „Biomagnetismus“
E-Mail: dietmar.eberbeck@ptb.de

² Dr. Lutz Trahms, Leiter des Fachbereichs „Biosignale“

der Umgebung (Serum, Blut oder Gewebe) praktisch ungehindert durchgelassen. Messungen in optisch trüben Medien sind also problemlos möglich.

- Die molekulare Umgebung der magnetischen Sonden ist dia- oder paramagnetisch und erzeugt kein eigenes störendes Hintergrundsignal.

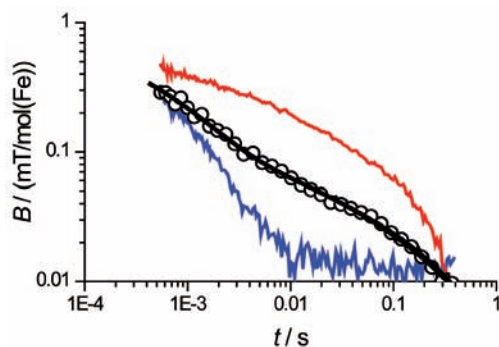


Bild 2:
Relaxationskurve einer Bindungsprobe (o) zusammen mit der Relaxationskurven der Referenzproben vollständig immobilisierter (rote Linie) und vollständig ungebundener (blaue Linie) magnetischer Sonden. Die durchgezogene schwarze Linie stellt die nach Gl. (1) angepasste Kurve dar. Die Konzentration der Nanopartikel in der Probe beträgt 1 nmol/L.

Die Relaxation des magnetischen Moments der Sonden wird durch deren Bindungszustand stark moduliert. Das magnetische Moment gebundener Sonden kann nur innerhalb des magnetischen Kernes der MNP mittels des Néel'schen Mechanismus relaxieren. Das Moment der ungebundenen Sonden relaxiert *zusätzlich* durch die Brownsche Bewegung der Nanopartikel im flüssigen Medium (Bild 1). Somit erlaubt die MRX die gleichzeitige Quantifizierung gebundener und ungebundener Sonden ohne Waschschritte. Dieser Ansatz wird als homogener Assay bezeichnet.

Die Signalbeiträge von gebundenen, d. h. immobilisierten, und ungebundenen Sonden, $B_{\text{imm}}(t)$ und $B_{\text{ub}}(t)$, lassen sich voneinander separieren, indem man das Modell

$$B(t) = \beta B_{\text{imm}}(t) + (1-\beta) B_{\text{ub}}(t) \quad (1)$$

an die Messkurve anpasst, wobei β den einzigen wesentlichen Fitparameter darstellt, da $B_{\text{imm}}(t)$ durch Messung an getrockneten Sonden und $B_{\text{ub}}(t)$ durch Messung einer flüssigen Probe mit Sonden aber ohne Analyt vorher separat ermittelt werden können (siehe Bild 2).

Da die Magnetrelaxometrie wiederholte Messungen erlaubt, kann so zum Beispiel die Bindungskinetik über einen Zeitraum von einigen Sekunden bis zu mehreren Tagen untersucht werden.

Beispiele für MNP-basierte Bindungsassays

Vor der Durchführung eines so genannten Festphasenassays werden die nachzuweisenden Analytmoleküle an eine feste Phase gebunden. Als Reaktionsgefäß wird beispielsweise ein separates 150 μl Well einer 96-Well-Platte genutzt. Dieses wird mit dem nachzuweisenden Analyten, der an die aktivierte Oberfläche z. B. durch Ionenaustauschkopplung oder assoziativ über ein Fangmolekül bindet, inkubiert. Danach wird das Probengefäß gespült, um ungebundene Analytmoleküle zu entfernen.

Im nächsten Schritt werden die magnetischen Sonden mit den spezifisch bindenden Liganden in das vorbereitete Well gegeben, die dann an die Analytmoleküle auf der Oberfläche binden (Bild 3). Daraufhin wird die Probe magnetrelaxometrisch ausgemessen (homogener Assay)

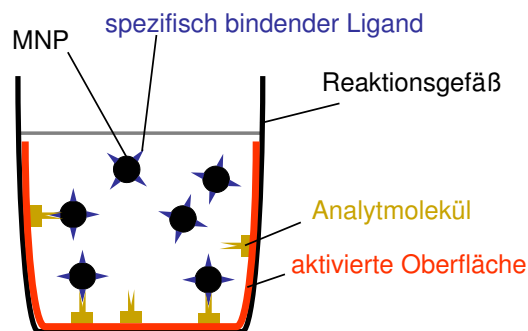


Bild 3:
Schema der Bindung magnetischer Sonden in einem einfachen homogenen Festphasenbindungsassay.

Das entscheidende Leistungsmerkmal eines Assays ist die Kalibrier- oder Dose-Response-Kurve (Bild 4). Die Sensitivität ist dabei die Analytkonzentration, bei der sich das gemessene Signal signifikant von dem Untergrundsignal des Assays abhebt. Im gegebenen homogenen Assay zum Nachweis von biotiniliertem biovinem Serum albumin (B-BSA) durch streptavidingekoppelte MNP (Bild 3) liegt die Nachweisgrenze bei 200 pmol/l bis 300 pmol/l (Bild 4). Der Dynamikbereich, d. h. der Konzentrationsbereich, der sich von der Sensitivitätsgrenze bis zur Signalsättigungsgrenze erstreckt, beträgt 1,5 Größenordnungen in der Analytkonzentration.

Zur Erhöhung der Sensitivität und zur Erweiterung des Dynamikbereiches wurde ein weiterer Assay realisiert, bei dem poröse Mini-durchflusssäulen (3D-Filter, Senova AG) als feste Phase genutzt wurden, deren innere Oberfläche

15 mal größer als die Oberfläche der Wells ist. Die Analytmoleküle (B-BSA) werden in den Filter immobilisiert, indem die Analytlösung in einer Säule die Filter durchströmt. Das eingesetzte Probenvolumen ist dabei 10 mal größer als im Fall des wellbasierten Assays. Der Analyt wird jedoch durch das Durchflussprinzip in den Filter angereichert, so dass das schliesslich mit MRX untersuchte Probenvolumen dem der Wells etwa entspricht. Im nächsten Schritt strömt die SONDENSUSPENSION durch die Durchflusssäule, wobei die nicht bindenden Sonden aus den Filter wieder ausgespült werden. Hier handelt es sich also um einen heterogenen Assay. In diesem Fall ist die Nachweisgrenze mit 10 pmol B-BSA pro Liter Medium (Bild 4) etwa 20 bis 30 mal niedriger als im wellbasierten homogenen Assay. Das ist zum einen auf die größere innere Oberfläche der Filter und zum anderen darauf zurückzuführen, dass im heterogenen Assay kein Signal von ungebundenen Sonden vorliegt. Damit im Zusammenhang steht auch der höhere Dynamikbereich, der hier etwa 4.5 Größenordnungen überstreicht.

Die Sensitivität und die Dynamik können auch durch die Verwendung von μm -großen Agarosekügelchen als feste Phase erhöht werden, die eine große Gesamtoberfläche pro Volumen aufweisen [1]. **Des weiteren können** Assays ohne feste Phase realisiert werden, bei denen multivalente Sonden durch die spezifische Bindung an multivalente Analyte aggregieren, wodurch die Brownsche Relaxation der Sonden-Analyt-Konjugate im Vergleich zu derjenigen der ungebundenen Sonden stark verlangsamt wird. Die Relaxationssignale der Aggregate sind von denen ungebundener Sonden ähnlich gut zu separieren wie die Signale der vollständig immobilisierten Sonden im beschriebenen Festphasenassay.

Gegenwärtig wird die Magnetrelaxometrie in einer Reihe von Projekten an der PTB weiterentwickelt. Über die Untersuchung des Aggregationsverhaltens der Sonden soll in Zusammenarbeit mit Partikelherstellern ein Werkzeug zur Qualitätssicherung magnetischer Nanopartikel etabliert werden. Ein zentraler Punkt beim Einsatz von Immunoassays ist die Überprüfung der Funktionalisierung der Nanopartikel mit den geeigneten Antikörpern. Hier kann die Magnetrelaxometrie eingesetzt werden, um die Bindungskapazität sowohl des Analyten, z. B. von Blutzellen, als auch der magnetischen Sonden zu messen. Selbst im Serum [1] **und im Vollblut** [3;1] konnten bereits Bindungsreaktionen quantitativ analysiert werden. Die Methode eignet sich auch zur Untersuchung von Bindungsreaktionen im lebenden Organismus. Für diese Anwendung wurden im Rahmen von Drittmittelvorhaben geeignete Messgeräte entwickelt [4].

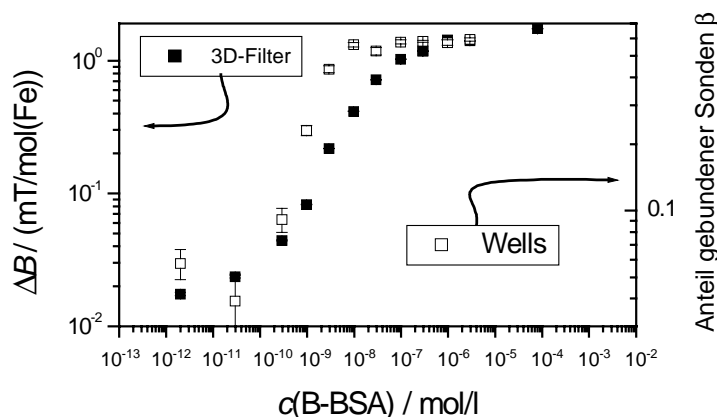


Bild 4:

Kalibrierkurven für einen Bindungsassay bei dem biotinyliertes Bovine Serum Albumin (B-BSA) als Analyt mittels Streptavidin-MNP-Sonden quantifiziert wird. Der Assay wurde als homogener Bindungsassay in 150 μl Wells (96-Wellplate) und als heterogener Assay unter Nutzung poröser Mini durchflusssäulen (Filter) ausgeführt.

Literatur

- [1] Eberbeck, D.; Bergemann, C.; Wiekhorst, F.; Steinhoff, U. and Trahms, L.: Quantification of specific bindings of biomolecules by magnetorelaxometry. *Journal of Nanobiotechnology*, 6 (2008), 4
- [2] Kötitz, R.; Trahms, L.; Koch, H. and Weitschies: W 1995 Ferrofluid relaxation for biomagnetic imaging: Baumgartner, C.; Deecke, L.; Williamson, S.J. (Hrsg.), *Biomagnetism: Fundamental Research and Clinical Applications*. Elsevier Science
- [3] Lange, J.: Spezifisch bindende magnetische Nanopartikel als Signalgeber in magnetischen Relaxationsmessungen. Dissertation, Ernst-Moritz-Arndt Universität, Greifswald, 2001.
- [4] Wiekhorst, F.; Eberbeck, D.; Steinhoff, U.; Gutkelch, D.; Trahms, L.: L. SQUID-basierte Magnetrelaxometrie an magnetischen Nanopartikeln für die medizinische Diagnostik: Abschlussbericht des BMBF-Projektes FKZ 13N8538, 62 S., Hannover : Technische Informationsbibliothek u. Universitätsbibliothek, <http://edok01.tib.uni-hannover.de/edoks/e01fb08/576714585.pdf>

Xenon als spezifische Sonde für die Magnetresonanztomographie

Wolfgang Kilian¹, Frank Seifert², Bernd Ittermann³

1 Protonen-Magnetresonanztomographie

Seit vielen Jahren ist die Protonen-Magnetresonanztomographie (¹H-MRT) ein wichtiger Bestandteil in der bildgebenden Diagnostik. Als Signalquelle dient dabei das magnetische Moment des Protons im Wasserstoffatom. Diese Protonen-Magnetresonanz (¹H-MR) ist eine Messmethode mit intrinsisch sehr geringen Signalstärken. Eine orts aufgelöste Darstellung von Körperteilen, also eine Tomographie, ist nur aufgrund der hohen Zahl von Wasserstoffatomen im Wasser möglich, aus welchem Weichteilgewebe überwiegend besteht. Weltweit werden Forschungsarbeiten in großer Zahl durchgeführt, um die Empfindlichkeit und Aussagekraft der MRT zu steigern. Besonders intensiv wird die Verwendung von Kontrastmitteln zur Beeinflussung der ¹H-MR Signale untersucht. In den letzten Jahren wurden derartige Kontrastmittel auch an spezifisch bindende Moleküle oder an Zellen gebunden und ihre spezifische Anreicherung im Körper mittels MRT dargestellt [1]. Eine weitere Möglichkeit, um auf molekularer Ebene Aussagen mittels MR-Messungen gewinnen zu können, stellt die MR-Spektroskopie (MRS) dar. Hier wird nicht nur die lokale Verteilung der Signalstärken gemessen, sondern auch deren spektrale Verteilung. Je nach chemischer Umgebung der Wasserstoffatome ändert sich die Resonanzfrequenz des Kernspinsignals (chemische Verschiebung), so dass man nicht nur die Gewebearten unterscheiden, sondern auch den biologischen Zustand charakterisieren kann. Hier ist die Untersuchung von Stoffwechselprodukten (Metaboliten) im Gehirn ein bedeutendes Forschungsgebiet [2]. Die MRS kann nicht nur rein qualitativ durchgeführt werden, sondern erlaubt es mit Hilfe von Referenzmessungen und mathematischen Analysen, auch quantitativ die molaren Metabolitkonzentrationen zu bestimmen [3].

2 Hyperpolarisierung von ¹²⁹Xe

Die bisher erwähnten Methoden sind bereits soweit erforscht und etabliert, dass sie zumindest in klinischen Studien eingesetzt werden. Ein wesentlich neueres Forschungsgebiet im Bereich der MRT ist die Abbildung von Atomen, deren Kernspins vor der Messung so präpariert wurden, dass das erzielbare MR-Signal um mehrere Größenordnungen über dem liegt, welches bei der Standard ¹H-MRT gewonnen wird. Der Prozess, welcher zu dieser Signalerhöhung führt, wird als Hyperpolarisierung bezeichnet, da die Polarisierung eines Ensembles von Kernspins ein Maß für das daraus erzielbare MR-Signal darstellt. Bei der klassischen ¹H-MR befinden sich die Atome und damit auch deren Kernspins im thermischen Gleichgewicht, wogegen sich bei hyperpolarisierten Medien die Polarisation der Kernspins fernab vom thermischen Gleichgewicht befindet. Ein derartiger Nichtgleichgewichtszustand strebt mit einer charakteristischen Zeitkonstante, der so genannten T_1 -Zeit, in das thermische Gleichgewicht zurück. Somit bedarf es besonderer Vorkehrungen und MR-Messsequenzen, um ein Maximum an Signal aus dem hyperpolarisierten Zustand zu erzielen. Zeit ist hierbei ein kritischer Faktor, der die Produktion des hyperpolarisierten Mediums nahe am Ort der Untersuchung erfordert. Lediglich für hyperpolarisiertes ³He wurden bisher Relaxationszeiten von 100 Stunden und länger erzielt, so dass das hyperpolarisierte Gas weltweit verschickt werden konnte, um damit MRT Untersuchungen durchzuführen [4].

An der PTB wurde in unmittelbarer Nähe des MR-Tomographen ein Polarisator aufgebaut [5], der es erlaubt, etwa einen halben Liter Xenon-Gas mit ¹²⁹Xe-Kernspinspolarisationen (das stabile Xenon-Isotop mit dem MRT-relevanten Kernspin $I = 1/2$) von etwa 20 % zu erzeugen. Unter Verwendung des optischen Spinaustauschpumpens, wie es von Walker und Happer [6] beschrieben wurde, werden derartige Polarisierungen weltweit nur mit wenigen Apparaturen erzielt. Allein in einem Labor der University of New Hampshire ist

¹ Dr. Wolfgang Kilian, Arbeitsgruppe „MR-Messtechnik“, E-Mail: wolfgang.kilian@ptb.de

² Dr. Frank Seifert, Leiter der Arbeitsgruppe „MR-Messtechnik“,

³ Dr. Bernd Ittermann, Leiter des Fachbereichs „Medizinische Messtechnik“

es in den letzten Jahren gelungen, mit einem verbesserten Verfahren noch größere Mengen von hoch polarisiertem ^{129}Xe zu erzeugen [7].

3 ^{129}Xe -Magnetresonanztomographie

Bereits Albert et al. [8], die erstmals MR-Bildgebung mit Hilfe von hyperpolarisierten Gasen zeigen konnten, wiesen darauf hin, dass hyperpolarisiertes ^{129}Xe medizinisch-diagnostisch sehr interessant sei. Aufgrund seiner guten Löslichkeit in Blut und Gewebe sollte ^{129}Xe nach dem Einatmen nicht allein in der Gasphase detektierbar sein, sondern auch in vielen Organen. Des Weiteren war bekannt, dass bei der MRS von ^{129}Xe sehr große chemische Verschiebungen in Lösungsmitteln und an Proteinen und Zellmembranen gemessen werden. Demnach sollte eine klare Zuordnung der ^{129}Xe -Signale zu den unterschiedlichen Gewebearten möglich sein, und die ^{129}Xe -MR wurde als das Mittel der Wahl zur Aufklärung der anästhetischen Wirkung von Xenon angesehen [9].

Die ersten biomedizinischen Ergebnisse mit hyperpolarisiertem ^{129}Xe wurden in der wegweisenden Arbeit von Mugler et al. [10] gezeigt. Hier konnten bereits am Menschen MR-Signale detektiert werden, welche von ^{129}Xe stammten, das sowohl im Brustkorb als auch im Kopf gelöst war. Im Folgenden konnte von Swanson et al. die erste Bildgebung der chemischen Verschiebung (CSI) an ^{129}Xe im Rattenhirn [11] und von Meier et al. [12] die Existenz mehrerer Signale bei der MRS von ^{129}Xe im menschlichen Kopf gezeigt werden (Bild 1). Eine Zuordnung dieser Signale zu einzelnen Gewebearten war damals jedoch noch nicht möglich. Hier setzten die Untersuchungen mit hyperpolarisiertem ^{129}Xe an der PTB ein, da erst die Kenntnis dieser Zuordnung die ^{129}Xe -MRT als molekulare und zelluläre Sonde in der medizinischen Forschung und Diagnostik anwendbar macht.

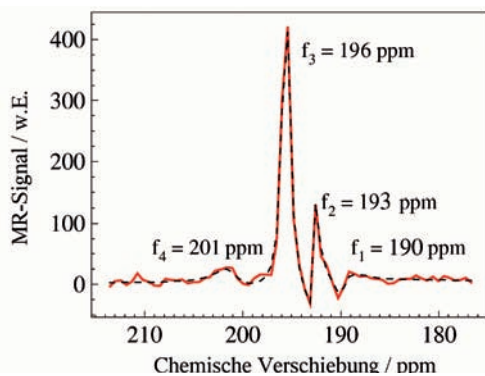


Bild 1: ^{129}Xe MR-Signale (rote Linie) gelöst im menschlichen Kopf, gemessen 20 Sekunden nach dem Einatmen von etwa 0,7 Liter hyperpolarisiertem ^{129}Xe -Gas [14] und Anpassung der Signale an vier Linien f_1 bis f_4 (gestrichelte Linie) mit Hilfe des Auswertalgorithmus von Elster et al. [3].

4 Dynamik der ^{129}Xe -Signale im menschlichen Gehirn

Mit Hilfe eines physiologischen Modells ergibt sich aus der Menge an eingeatmetem Xenon Gas, den bekannten Löslichkeitskoeffizienten von Xenon in Blut und Gehirngewebe und der Zeit bis das Blut von der Lunge zum Gehirn gelangt, die Konzentrationen von Xenon in den beiden Hauptgewebearten graue und weiße Substanz im Gehirn [13]. Berücksichtigt man weiterhin den Zerfall der Hyperpolarisation in der Lunge, im Blut und im Gehirngewebe und zusätzlich, dass durch die MR-Messung selbst die ^{129}Xe -Polarisation zerstört wird, so erhält man für die Konzentration von hyperpolarisiertem ^{129}Xe die durchgezogenen Linien in Bild 2 [14]. Misst man nun alle zwei Sekunden ein MR-Spektrum wie in Bild 1 gezeigt und trägt die Signalintensität der beiden Hauptsignale von f_2 und f_3 über die Zeit auf, so lassen sich mit einem einzigen Skalierungsfaktor die gemessenen Signale mit den berechneten Konzentrationen in Übereinstimmung bringen (Bild 2) [14].

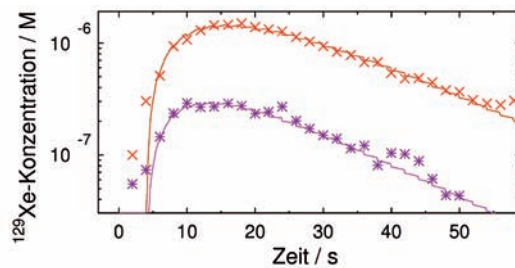


Bild 2: Zeitverlauf der gemessenen ^{129}Xe -Signale bei 196 ppm (x) und 193 ppm (*) nach dem Einatmen von hyperpolarisiertem ^{129}Xe -Gas zum Zeitpunkt $t = 0$ s. Verlauf der berechneten Konzentration von hyperpolarisiertem ^{129}Xe in grauer (—) und weißer (—) Substanz.

Die Vermutung, dass das dominante Signal bei 196 ppm von ^{129}Xe gelöst in grauer Substanz stammt, wurde bereits anhand der ersten spektroskopischen ^{129}Xe Messungen [10, 11] entwickelt. Die nahezu perfekte Übereinstimmung des Zeitverlaufes von gemessenen Signalamplituden und berechneten Konzentrationen bestärkt diese Vermutung. Darüber hinaus wird sofort ersichtlich, dass, wenn man das Signal bei 196 ppm dem in grauer Substanz gelöstem ^{129}Xe zuordnet, sich sofort das Signal bei 193 ppm dem in weißer Substanz gelöstem ^{129}Xe zuordnen lässt, da das Verhältnis der beiden Signale exakt dem Konzentrationsverhältnis entspricht. Somit war es uns bereits ohne ortsaufgelöste spektroskopische Messungen gelungen, klare Hinweise für die Zuordnung der gemessenen Signale zu erhalten.

5 Bildgebung von ^{129}Xe im menschlichen Kopf

Um sicher zu stellen, dass die beiden Hauptsignale bei 196 ppm und 193 ppm aus dem Gehirn stammen, wurde von uns eine MR-Sequenz zur orts aufgelösten spektroskopischen Bildgebung (CSI) für die Verwendung von hyperpolarisiertem ^{129}Xe optimiert, womit wir erstmals CSI-Aufnahmen von ^{129}Xe im menschlichen Gehirn durchführen konnten [15]. Nach weiteren Optimierungsschritten ist es dann auch gelungen, alle vier ^{129}Xe Signale, die am menschlichen Kopf gemessen werden, abzubilden [16]. Derartige CSI-Messungen sind aufgrund der – verglichen mit hyperpolarisierten Gasen in der Lunge – sehr viel geringeren Signalstärke nur mit deutlich geringerer Auflösung möglich (2 cm \times 2 cm in der Ebene und eine Projektion senkrecht dazu). Dennoch ist in den Bildern (Bild 3) klar zu erkennen, dass die beiden starken Linien nur aus Gehirnbereichen gewonnen werden (Bild 3 c, d, h, i), wogegen die beiden schwächeren Signale unterhalb des Gehirns im Hals-Rachenraum gemessen werden (Bild 3 b, e, g, j). Das Gasphasensignal (0 ppm) stammt von dem Restgas in dem Kunststoffbeutel, aus welchem das hyperpolarisierte ^{129}Xe eingeatmet wurde.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Nimmt man alle unsere Ergebnisse und auch neueste Tierexperimente [17] zusammen, so ergibt sich ein sehr stimmiges Bild, aus dem geschlossen werden kann, dass die beiden

schwachen Signale aus Bereichen außerhalb des Gehirns stammen und die beiden starken Signale von im Gehirngewebe gelöstem ^{129}Xe her rühren. Die Zuordnung zu in grauer und weißer Substanz gelöstem ^{129}Xe ist zwar schon recht fundiert, muss aber noch durch bildgebende Messungen eindeutig bestätigt werden. Hierfür muss die Auflösung der CSI-Messungen erhöht werden, um eine Verteilung zu messen, die eine eindeutige Zuordnung erlaubt. Berechnungen zur Erhöhung der räumlichen Auflösung der CSI-Sequenz wurden bereits durchgeführt.

Auf der Basis einer zweifelsfreien Zuordnung der beiden stärksten ^{129}Xe -Signale zu Xenon, gelöst in grauer und weißer Substanz, stünde ein bildgebendes Verfahren zur Verfügung, welches, anders als die gadoliniumbasierten Kontrastmittel, bei der ^1H -MRT nur dann detektiert wird, wenn sich Xenon in dem entsprechenden Gewebe befindet. Aufgrund der beiden unabhängigen Signale bei 196 ppm und 193 ppm sollten sich pathologische Veränderungen sowohl auf das Verhältnis der beiden Signalamplituden zueinander auswirken, als auch auf die chemische Verschiebung. Dies würde zu sehr spezifischen Signaländerungen führen und damit trotz der vergleichsweise geringen räumlichen Auflösung medizinisch relevante Ergebnisse liefern.

Ein Weg von der hier beschriebenen zellulär spezifischen ^{129}Xe -MRT hin zur molekularen ^{129}Xe -Bildgebung wurde von Schröder et al. [18] aufgezeigt. Hier wird ebenfalls die Tatsache ausgenutzt, dass die chemische Verschiebung des

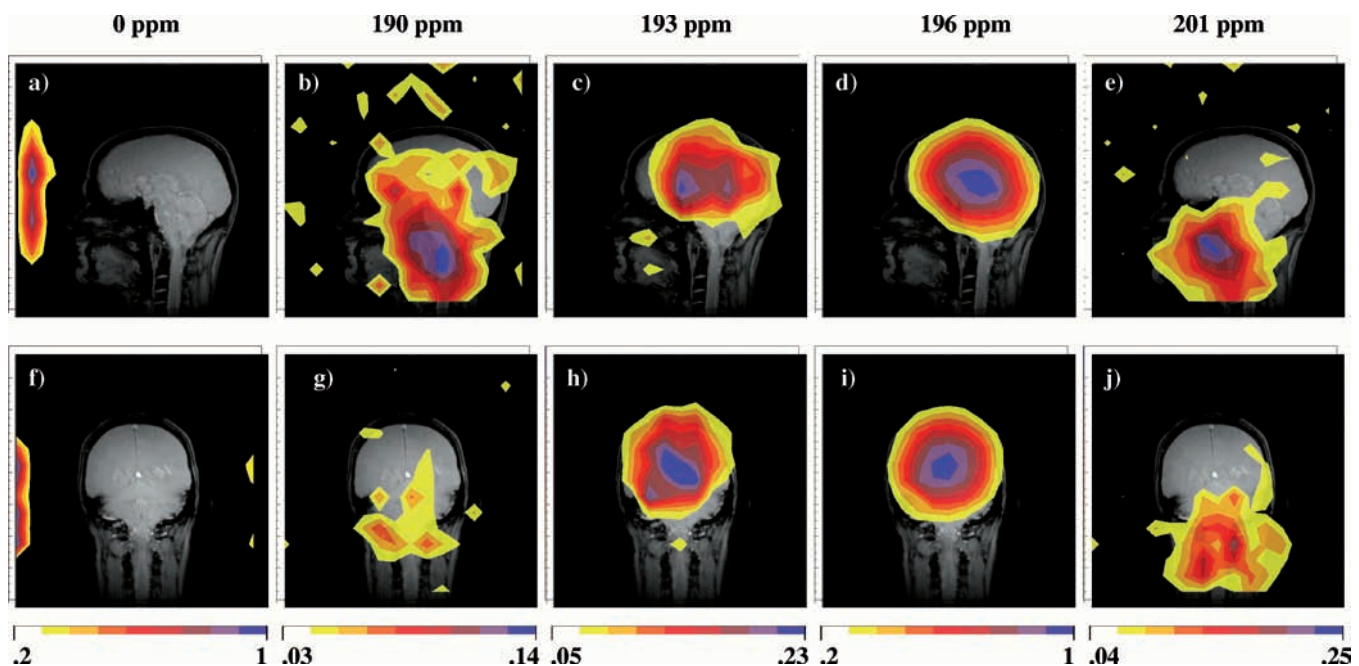


Bild 3: Falschfarbendarstellung der CSI-Signalstärken von ^{129}Xe in der Gasphase (0 ppm, a, f) und gelöst im menschlichen Kopf (190 ppm, 193 ppm, 196 ppm und 201 ppm). Zur Orientierung sind ^1H MR-Aufnahmen der beiden Orientierungen (sagittal und coronal) als Graubilder unterlegt.

^{129}Xe -Signals sehr stark von der direkten Umgebung des Xenonatoms abhängt und damit auch spezifische Ligand-Protein-Bindungen mittels MRT abgebildet werden können. Auf diesem Forschungsgebiet wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Dr. C. Freund vom Leibniz-Zentrum für Molekulare Pharmakologie (FMP) in Berlin-Buch erste viel versprechende Untersuchungen durchgeführt [19].

7 Literatur

- [1] Hoehn, M.; Himmelreich, U.; Kruttwig, K. und Wiedermann, D.: Molecular and cellular MR imaging: Potentials and challenges for neurological applications. *J. Magn. Reson. Imaging* **27**, (2008), 941–954
- [2] Schubert, F.; Gallinat, J.; Seifert, F.; Rinneberg, H.: Glutamate concentrations in human brain using single voxel proton magnetic resonance spectroscopy at 3 Tesla. *Neuroimage* **21**, (2004), 1762–1771
- [3] Elster, C.; Schubert, F.; Link, F.; Walzel, M.; Seifert, F.; Rinneberg, H.: Quantitative MRS: Semi-parametric modelling and determination of uncertainties. *Magn. Reson. Med.* **53**, (2005), 1288–1296
- [4] Wild, J.M. et al.: MR imaging of the lungs with hyperpolarized helium-3 gas transported by air. *Phys. Med. Biol.* **47**, (2002), N185–N190
- [5] Kilian, W.: Erzeugung von hyperpolarisiertem ^{129}Xe -Gas und Nachweis mittels in vivo NMR-Bildgebung, NMR-Spektroskopie sowie SQUID-Messtechnik. Dissertation, Freie Universität Berlin, (2001) www.diss.fu-berlin.de/2001/105
- [6] Walker, T.; Happer, W.: Spin-exchange optical pumping of noble-gas nuclei. *Ref. Mod. Phys.* **69**, (1997), 629–642
- [7] Patz, S.; Hersman, F. W.; Muradian, I.; Hrovat, M. I.; Ruset, I. C.; Ketel, S.; Jacobson, F.; Topulos, G. P.; Hatabu, H.; Butler, J. P.: Hyperpolarized ^{129}Xe MRI: A viable functional lung imaging modality?. *Eur. J. Radiol.*, **64**, (2007), 335–344
- [8] Albert, M. S.; Cates, G. C.; Driehuys, B.; Happer, W.; Saam, B.; Springer Jr, C. S.; Wishnia, A.: Biological magnetic resonance imaging using laser-polarized ^{129}Xe . *Nature*, **370**, (1994), 199–201
- [9] Miller, K. W.; Reo, N. V.; Uiterkamp, A. J. M. S.; Stengle, D. P.; Stengle, T. R.; Williamson, K. L.: Xenon NMR: Chemical Shifts of a General Anesthetic in Common Solvents, Proteins, and Membranes. *PNAS*, **78**, (1981), 4946–4949
- [10] Mugler III, J. P.; et al.: MR Imaging and Spectroscopy Using Hyperpolarized ^{129}Xe Gas: Preliminary Human Results. *Magn. Reson. Med.*, **37**, (1997), 809–815
- [11] Swanson, S. D.; Rosen, M. S.; Agranoff, B. W.; Coulter, K. P.; Welsh, R. C.; Chupp, T. E.: Brain MRI with Laser-polarized ^{129}Xe . *Magn. Reson. Med.*, **38**, (1997), 695–698
- [12] Maier, T.; Driehuys, B.; Hinton, D. P.; Knight-Scott, J.; Mugler III, J. P.; Brookeman, J. R.: Detection of Dissolved Hyperpolarized ^{129}Xe in the Human Brain. *Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med.*, **6**, (1998), 1907
- [13] Kety, S. S.: The Theory and Applications of the Exchange of Inert Gas at the Lungs and Tissues. *Pharmacol. Rev.*, **3**, (1951), 1–41
- [14] Kilian, W.; Seifert, F.; Rinneberg, H.: Dynamic NMR Spectroscopy of Hyperpolarized ^{129}Xe in Human Brain Analyzed by an Uptake Model. *Magn. Reson. Med.*, **51**, (2004), 843–847
- [15] Kilian, W.; Seifert, F.; Rinneberg, H.: Time- and spatially-resolved in vivo human brain MR-spectroscopy using hyperpolarized ^{129}Xe . *Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med.*, **12**, (2004), 767
- [16] Kilian, W.; Seifert, F.: 2D Chemical Shift Imaging of hyperpolarized isotopically enriched ^{129}Xe within human brain. *Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med.*, **13**, (2005), 1163
- [17] Kershaw, J.; Nakamura, K.; Kondoh, Y.; Wakai, A.; Suzuki, N.; Kanno, I.: Confirming the Existence of Five Peaks in ^{129}Xe Rat Head Spectra. *Magn. Reson. Med.*, **57**, (2007), 791–797
- [18] Schröder, L.; Lowery, T. J.; Hilty, C.; Wemmer, D. E.; Pines, A.: Molecular imaging using a targeted magnetic resonance hyperpolarized biosensor. *Science* **314**, (2006), 446–449
- [18] Schlundt, A.; Kilian, W.; Beyermann, M.; Sticht, J.; Günther, S.; Hoepfner, S.; Roetzschke, O.; Mitschang, L.; Freund, C.: Challenging MHC class II molecules by NMR spectroscopy; in Vorbereitung