

Zellsortierung

Die Guten ins Töpfchen

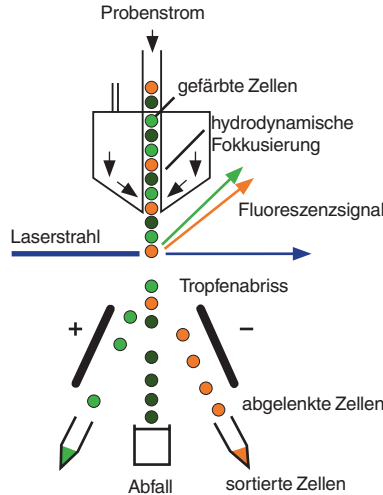
Wallace Coulter legte bereits Ende der fünfziger Jahre den Grundstein für die Durchflusszytometrie. Er ließ sich eine Methode patentieren, um Partikel in einer Flüssigkeit zu zählen und vereinfachte damit die Leukozytenzählung bei der Blutanalyse. Mittlerweile sind Durchflusszytometer in unzähligen Forschungseinrichtungen und Routinelaboratorien zu finden. In der Medizin ist das Verfahren ein wichtiger Bestandteil der Diagnostik und Verlaufsbeobachtung von Erkrankungen wie Leukämien und Lymphomen.

Die hydrodynamische Fokussierung bildet die Voraussetzung, um fluoreszenzmarkierte Zellen mithilfe der Durchflusszytometrie auftrennen zu können. Dank dieser Fokussierung werden die vereinzelt Zellen aufgereiht wie auf einer Perlenkette an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeführt. Der Laser regt die Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes an, die dadurch auf ein höheres Energieniveau gehoben werden. Fallen die Elektronen auf ihr ursprüngliches Niveau zurück, geben sie die Energie in Form von Photonen wieder ab. Da die emittierte Energie proportional zur Menge der gebundenen Antikörper und damit der Zellen ist, kann man mit einem Photodetektor, die Zellzahl bestimmen. Darüber hinaus beeinflusst die Zellgröße und Struktur die Lichtbeugung und Streuung. Aus diesen Informationen kann man somit auch auf Eigenschaften wie Zellkerngröße schließen.

Zellsortierung

Die fluoreszenzaktivierte Zellanalyse (FACS, Fluorescence Activated Cell Sorting) basiert auf einer immunologischen Reaktion, der Antigen-Antikörper-Reaktion. Bei dieser Methode binden grün-, gelb- und rot-fluoreszenzmarkierte Antikörper an Oberflächenmoleküle einer Zelle oder intrazelluläre Proteine, wodurch die Zellen spezifisch markiert werden.

Wie in einem klassischen Durchflusszytometer misst der Sorter die Fluoreszenzintensitäten der mit Laserlicht angeregten Zellen in dem Flüssigkeitsstrahl. Nach jeder Messung wird der Druck auf den Flüssigkeitsstrahl kurzfristig reduziert, sodass sich Tröpfchen bilden. Die Sortierelektronik des Systems lädt die Tröpfchen entweder positiv oder negativ



Schematische Darstellung der Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung. Der Sorter lenkt die markierten Zellen in jeweils unterschiedliche Richtungen ab und ermöglicht dadurch eine Sortierung. (Bildquelle: www.facsclab.toxicologie.uni-mainz.de/).

auf. Diese Tröpfchen werden ihrer Ladung entsprechend in dem elektrischen Feld des Gerätes entweder nach links oder nach rechts elektrostatisch abgelenkt und

lassen sich getrennt voneinander auffangen. Die gemessenen Fluoreszenzen der Zellen werden in Form eines Histogramms grafisch dargestellt, in dem man die anzureichernden Populationen markieren und die Ladung festlegen kann.

Setzt man unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe ein, können je nach verwendetem System gleichzeitig mehrere Parameter gemessen werden. Die Farbstoffe werden bei der gleichen Wellenlänge angeregt, emittieren aber unterschiedliche Fluoreszenzfarben. In der Durchflusszytometrie häufig eingesetzte Fluoreszenzfarbstoffe sind APC-Cy7, PE-Cy5 oder Red613. Durchflusszytometer können mehrere tausend Partikel in der Sekunde gleichzeitig analysieren und sortieren.

Farbstoffe, die Nukleinsäuren anfärben, erlauben Untersuchungen zum Zellzyklus oder Apoptose-Assays. Andere Farbstoffe liefern einen Einblick in den intrazellulären pH-Wert oder Ionenstrom an Zellmembranen. GFP ist ein fluoreszierendes Protein, das die Zelle selbst synthetisiert und z. B. zur durchflusszytometrischen Kontrolle der Transfektionseffizienz eines Gens in einer Zelle eingesetzt werden kann. ■

os

Die Kraft des Lichts

Laserstrahlen können nicht nur Zellen zählen oder sortieren, sondern auch als optische Pinzetten fungieren. Die Systeme hierfür bestehen im Prinzip aus einem Laser, der die Probe fängt und in einer optischen Falle festhält, und einem Mikroskop mit angeschlossener Kamera, mit denen sich der Probenkörper beobachten und Messungen daran durchführen lassen. Optische Pinzetten können Teilchen mit einem Durchmesser von einigen wenigen bis zu 100 Mikrometern greifen und an einen bestimmten Ort hinbewegen.

In der Regel arbeitet man in einem Wellenlängenbereich zwischen 700 und 1100 Nanometern. In diesem optischen Fenster heizen die Laserstrahlen die Bestandteile von biologischen Proben am wenigsten auf.

In biologischen Laboratorien werden die Pinzetten hauptsächlich eingesetzt, um Zellen zu bearbeiten oder zu untersuchen. Dieses Werkzeug wird beispielsweise bei der in vitro Fertilisation genutzt, wo die Pinzetten Spermien zur Eizelle transportieren.

Wie aber entstehen die physikalischen Kräfte, die sonst nur mit mechanischen Instrumenten möglich sind? Trifft ein fokussierter Laserstrahl auf ein Objekt, wird er beim Ein- und Austritt an der Oberfläche abgelenkt und überträgt einen Impuls auf die Probe. Durch die Impulsänderung entsteht eine Kraft, die proportional zur Intensität des einfallenden Lichts ist und das Objekt festhalten kann. Je stärker die Ablenkung ist, desto stärker ist die Kraft. Das funktioniert aber nur, wenn die Probe transparent und der Brechungsindex der Probe höher ist als der des umgebenden Mediums. Die Kraft, die man mithilfe der Laserstrahlen auf einen Körper ausüben kann, ist allerdings begrenzt. Erhöht man die Laserintensität zu stark, können besonders biologische Proben irreversibel geschädigt werden. Mittlerweile existieren Systeme, die eine Kombination aus lenkbaren Spiegeln enthalten, sodass mehrere optische Fallen aufgestellt werden können. Unterschiedliche Körper lassen sich somit z.B. aufeinander zu bewegen. Der mechanische Aufwand ist jedoch entsprechend hoch.

Quantifizierung der zellulären Immunantwort

Das Immunsystem nutzt unterschiedliche Wege, um Krankheitserreger wie Bakterien, Viren oder Pilze abzuwehren. Die Basis für die Immunantwort bilden dabei humorale und zelluläre Komponenten. Die Quantifizierung der zellulären Immunantwort mit neuen Reagenzien kann eine Momentaufnahme des Immunstatus liefern wie sie bislang nicht möglich war.

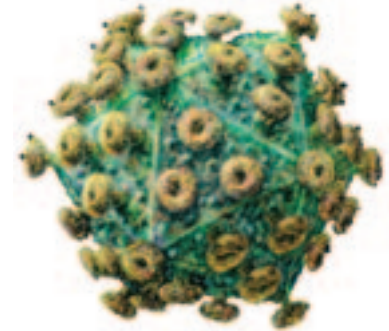
Bei einer Infektionskrankheit dringen die Erreger in die Zellen ein und entziehen sich zunächst einer Antikörperantwort durch den Organismus. Zellen, die beispielsweise mit einem Virus infiziert wurden, zerlegen jedoch die körperfremden viralen Proteine in Bruchstücke, laden sie in eine Tasche des MHC-Komplexes, eines speziellen Eiweißes, und transportieren sie zur Zelloberfläche. Mit den viralen Fragmenten auf der Oberfläche signalisieren die Zellen, dass sie infiziert sind. Das MHC-Molekül ist somit das Bindeglied zwischen Zelle und Immunsystem. Zytotoxische T-Zellen und Killerzellen erkennen als spezialisierte Immunzellen des Körpers diese Erregerbruchstücke als Angriffsziel und zerstören die infizierten Zellen, indem sie unter anderem toxische Substanzen freisetzen, welche die infizierten oder krankhaft veränderten

Zellen in die Apoptose, den programmierten Zelltod, treiben. Gleichzeitig wird ein Programm gestartet, das die Vermehrung der Virus-spezifischen T-Zellen bewirkt. Damit verhindert der Organismus, dass sich Erreger im Körper ausbreiten können.

Fast jeder zweite Mensch ist mit Herpes-Viren wie das Epstein-Barr Virus oder das Cytomegalovirus (CMV) infiziert und lebt damit unter normalen Umständen ohne gesundheitliche Einschränkungen. Antikörper und Virus-spezifische T-Zellen kontrollieren die latente Infektion und verhindern ein Ausbrechen einer Infektion.

Nach einem Stammzell-Transplantat kann es jedoch Monate dauern, bis sich aus den Stammzellen ein kompetentes Immunsystem formiert. Breitet sich das CMV-Virus während dieser Phase unbehindert und unerkannt aus, kann es zu einer lebensbedrohlichen Erkrankung kommen. Die quantitative Bestimmung der CMV-Viruslast mittels Real-Time-PCR (CMV-DNA) oder Immunhistochemie zeigt eine beginnende CMV-Reaktivierung an. Es lässt sich jedoch keine Aussage über die Immunantwort des Patienten gegen CMV treffen.

Funktionelle Tests haben gezeigt, dass die Anwesenheit CMV-spezifischer T-Zellen vor einer CMV-Erkrankung schützt.



Die quantitative Bestimmung von Viruspartikeln ist für das Monitoring von Infektionen wie HIV wesentlich. Mittlerweile kann auch die Reaktion auf die virale Belastung bestimmt werden (Abbildung: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines HIV-Partikels).

Die T-Zell-Reaktion gegen CMV richtet sich hauptsächlich gegen zwei Eiweiße, das strukturelle Protein pp65 und das Immediate Early Antigen IE1. Innerhalb des Eiweißes pp65 wird ein spezifisches Peptidfragment als immundominantes Epitop von HLA-Molekülen präsentiert und aktiviert CMV-spezifische T-Zellen. Mit jetzt zur Verfügung stehenden neuen Reagenzien lassen sich die CMV-spezifischen T-Zellen und damit die Immunrekonstitution eines Patienten quantifizieren.

Die gegenwärtige antivirale Behandlung mit Ganciclovir kann beträchtliche Nebeneffekte auslösen und sollte ausschließlich in Situationen zum Einsatz kommen, in denen der Nutzen das Risiko der medizinischen Behandlung übertrifft. Erste klinische Studien zeigen, dass Patienten eine erheblich bessere Prognose zeigen, bei denen nach Transplantation oder Stammzell-Transfer CMV-spezifische T-Zellen nachgewiesen werden können. Ebenso können bei ausbleibender Rekonstitution CMV-spezifischer T-Zellen Risiko-Patienten für CMV-Erkrankungen identifiziert werden. Das Monitoring der CMV-spezifischen Immunantwort trägt somit zu einer Verbesserung des Patientenmanagements durch individuelle Steuerung von Prophylaxe bei. ■

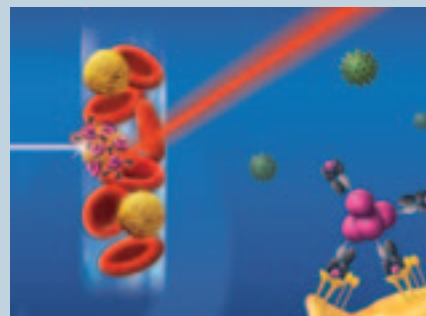
Tetramer-Technologie

Die Tetramer-Technologie ist ein neues Verfahren, das es erlaubt, T-Zell Reaktionen direkt und automatisiert zu quantifizieren. Mithilfe löslicher MHC-Moleküle als fluoreszierende Sonden kann man Antigen-spezifische T-Zellen stabil markieren und automatisiert detektieren. Die löslichen MHC-Peptid Moleküle binden in Form eines Tetramers an die T-Zellen. In monomerer Form würden die MHC-Moleküle wegen ihrer schwachen Bindungsstärke nicht stark genug an die jeweiligen Rezeptoren binden. Da sich Affinitäten jedoch additiv verhalten, sorgen die Tetramere für eine stabile Bindung an die entsprechenden T-Zellen.

Die Reagenzien erlauben somit eine neue Betrachtung der zellulären Immunantwort auf den Erreger und ermöglichen eine Momentaufnahme des Immunstatus. Die fluoreszierenden Sonden werden bereits beim Monitoring der T-Zell Reaktion auf CMV (bei Transplantatempfängern und nach Stammzell-Transfer), HIV, Hepatitis-B und C und zur Analyse Tumor-spezifischer T-Zellen eingesetzt. Die auf Tetrameren basierenden

flusscytophotometrischen Assays sind reproduzierbar und schnell.

Peter Doherty, Nobelpreisträger für Medizin, bescheinigt der Technologie, dass sie alles habe, um zum Gold-Standard der Quantifizierung Virus-spezifischer T-Zellen zu werden.



Die rekombinanten MHC-Komplexe binden als lösliche Sonden an die T-Zellen (rechts). Der gesamte Komplex lässt sich mithilfe eines Laserstrahls nachweisen.

Dr. Jürgen Walter
ORPEGEN Pharma GmbH
Heidelberg
Tel: 06221/9105-720
j.walter@orpegen.com
www.orpegen.com

Aufschwung in Sicht

Die fabelhafte Welt der Biochemie

Seit kurzem geht es mit dem Life-Science-Markt nach langer Flaute wieder aufwärts. Nun kommt es darauf an, geniale Ideen möglichst rasch in die medizinische Anwendung zu überführen.

Die Life Science Industrie hatte ihren Ursprung Mitte der siebziger Jahre in den USA. 1976 gründete der Biochemiker Herbert W. Boyer gemeinsam mit dem Investor Robert A. Swanson in San Francisco mit Genentech die erste Biotech-Firma, ein Unternehmen, das auch heute noch zu den größten Biotech-Firmen weltweit gehört. Nicht zuletzt aufgrund der intensiven Zusammenarbeit zwischen Industrie und Forschung entwickelten sich zu dieser Zeit Orte wie San Francisco und Boston schnell zu Biotechnologie-Hochburgen. In Europa ließ der Gründungsboom - besonders in Deutschland, wo das Gentechnikgesetz den Fortschritt lange behinderte - noch einige Jahre auf sich warten, kam Mitte der 90er-Jahre aber umso heftiger.

Viele findige Wissenschaftler gründeten mit wissenschaftlich brillanten Ideen neue Unternehmen und erhielten Unterstützung von Venture Capital Gesellschaften und anderen privaten Investoren. Die Entzifferung des menschlichen Genoms und die technologischen Fortschritte in der Proteomforschung forcierten die positive



Im Jahr 2002 verliebte sich ein Millionenpublikum in „Die fabelhafte Welt der Amélie“. Das schüchterne Mädchen Amélie ist die Mutter Theresa der Ungeliebten, die im Verborgenen Gutes tut, ohne ihren Ideenreichtum für sich selbst zu nützen. Manches in diesem Film erinnert an die fabelhafte Welt der Biochemie zu Beginn des 21. Jahrhunderts. Das junge Fach sprüht nur so vor Ideen für eine bessere Zukunft der oftmals schwer geplagten Medizin, doch wenn sie nicht wie Amélie eines Tages ihr eigenes Schicksal in die Hand nimmt, werden die Möglichkeiten reine Theorie bleiben.

Entwicklung. Ende 2000 lag die Zahl der registrierten Unternehmen in Deutschland bei 332.

So fundiert die Gründungsideen waren, so überlegt waren häufig auch die ökonomischen Konzepte. Als nach der Jahrtausendwende der neue Markt einbrach, zogen viele Investoren ihr Kapital auch aus

dem Life Science Sektor zurück, sodass kleinere Unternehmen die Durststrecke oft nicht durchhalten konnten.

Mittlerweile scheint sich die Branche wieder erholt zu haben. Nach Zahlen von Ernst & Young verzeichnete der Umsatz in Deutschland im vergangenen Jahr mit 832 Millionen Euro einen leichten Zuwachs. Dagegen ging die Zahl der Biotechnologie-Unternehmen durch Fusionen und Übernahmen auf 375 zurück. 30% der an der Studie beteiligten Unternehmen waren 2005 profitabel, nur elf Unternehmen gingen in die Insolvenz. Diese wiederlangte positive Stimmung in der Life Science Branche machte sich auch finanziell bemerkbar: 2005 flossen insgesamt 3,2 Milliarden Euro in die europäischen Biotechnologie-Unternehmen.

So erfreulich die wieder aufkeimende Investitionsneigung für forschende und entwickelnde Firmen sein mag, so wichtig ist es für einen nachhaltigen Aufschwung nun aber, in den nächsten Jahren den Sprung in die medizinische Routine zu schaffen. Erst wenn ein diagnostischer Test oder ein therapeutisches Verfahren von den Krankenkassen vergütet wird, haben sich die finanziellen Aufwendungen der Geldgeber und die Mühen der Wissenschaftler wirklich gelohnt. Deshalb muss mit den vollmundigen Versprechen der Forscher nun ernst gemacht werden. ■

os, gh



Low Density Arrays für die Bestimmung von 12 bis 384 Genen



Basierend auf der TaqMan Gene Expression Assay-Technologie von Applied Biosystems können Sie jetzt für jedes humane Gen ein optimiertes TaqMan®-QPCR-System bestellen. Die einzelnen Systeme lassen sich auf der neuen TaqMan Low Density Array Plattform frei wählbar gruppieren und erlauben die parallele Bestimmung von 12 bis 384 Genen aus einer biologischen Probe.

Was brauchen wir von Ihnen ?

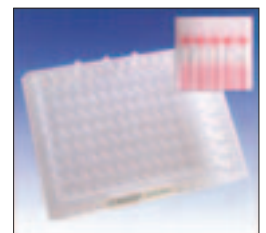
1. Benennung interessanter Gene für Ihr Problem

Was machen wir für Sie?

2. Auswahl Ihrer Gene für die TaqMan Low Density Arrays
3. Isolation der mRNA aus Ihrer Probe
4. Umschreiben der mRNA in cDNA
5. Durchführung der TaqMan-QPCR im IKDT
6. Übermittlung der Expressionsdaten an Sie
(Schritte 3 und 4 können auch durch Sie ausgeführt werden)

Vorteile für Sie:

- Optimierte TaqMan-QPCR Systeme für die Quantifizierung humaner Gene (derzeit ca. 200.000 Systeme verfügbar)
- Freie Kombination von bis zu 8 x 48 Ihrer krankheitspezifischen Gene (z.B. Tumoren, Stoffwechsel-Pathways)
- Sets auch für Maus und Ratte erhältlich
- schnell, preiswert und präzise



TaqMan Low Density Array
(Quelle: Applied Biosystems®)

Weitere Informationen unter:

Telefon: 030-8441 5540 · Telefax: 030-8441 5555 · genechips@ikdt.com · www.ikdt.de/low-density-arrays