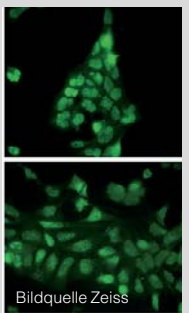


Ein Blick zurück

Gastkommentar

Angesichts der enormen Fortschritte der Lasermikrodissektion lohnt sich ein Blick zurück auf die Anfänge. Ich hatte das Glück, als „post-doc“ von 1994 bis 1998 in Dr. L. Liottas Labor für Pathologie am NCI in Bethesda (USA) zu arbeiten und dabei auch die hohe öffentliche Aufmerksamkeit mitzerleben, die die junge Lasertechnik dort genoss – bis hin zu einer Präsentation bei US-Vizepräsident Al Gore als Teil des *cancer genomic anatomy project* (CGAP).

Wie anders, aber ebenso zielsicher, die Situation in Deutschland, wo Frau Dr. Karin Schütze Anfang der 1990er-Jahre zusammen mit ihrem Mann daheim in Wolfratshausen experimentierte und 1993 ein kleines Start-up-Unternehmen gründete.



Embryonale Stammzellen werden mittels Lasermikrodissektion aus dem Verband isoliert. Die Expression des Pluripotenzmarkers Oct-4 (grün) bleibt dank des berührungslosen Eingriffs unverändert. Oben vor, unten nach LMD.

Letztlich gingen aus beiden Aktivitäten erfolgreiche Unternehmen hervor. Wie es aussieht, hat die in Deutschland entwickelte Technik, auf der die hier beschriebenen Verfahren großer deutscher Mikroskopentwickler und -Hersteller basieren, trotz bescheidenerer Anfänge derzeit die Nase vorn.



Prof. Dr. med. Axel Wellmann
Pathologisches Institut Celle
www.pathologen.net

Lasermikrodissektion

Gehaltvolle Löcher

Mit Lasertechnik kann man homogene Gewebeproben für die molekularbiologische Forschung gewinnen. Auch in der Krebsdiagnostik ist diese Technik einsetzbar, aber (noch) zu teuer.

Die Geschichte der Lasermikrodissektion (kurz LMD genannt) ist noch jung – und doch bereits eine Erfolgsgeschichte. Erstmals beschrieben wurde das Prinzip dieser „Laserchirurgie im Mikromaßstab“ 1996 in der Zeitschrift *Science*¹; noch im selben Jahr kamen zwei für wissenschaftliche Zwecke wirklich sinnvoll zu nutzende Systeme auf den Markt, eines aus den USA und eines aus Deutschland, und inzwischen sind bereits vier Gerätetypen erhältlich.

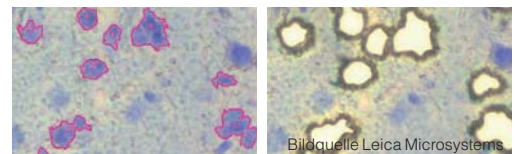
Das Ziel der Lasermikrodissektion in Forschung und Diagnostik ist es, eine möglichst homogene Gewebeprobe für genetische Untersuchungen zu gewinnen. Die Begriffe „Gewebe“ und „genetisch“ sind dabei je nach Anwendungsgebiet weit gefasst: Man isoliert zum Beispiel genau definierte Tumorareale, Bakterien, Pflanzenfasern, Chromosomen oder Zellkerne und analysiert darin nicht nur Gene, sondern auch Geneprodukte wie RNA und Proteine. Je homogener eine solche Probe, desto präziser ist die biochemische bzw. diagnostische Aussage.

Die Mikrodissektionseinheit besteht bei allen Systemen aus einem

Laser, einem Mikroskop mit Kamera und einer Bilderkennungssoftware. Der Laserstrahl wird so stark fokussiert, dass die Energiedichte ausreicht, um Gewebeareale, Einzelzellen oder subzelluläre Partikel aus der Probe herauszutrennen – gerade so, als würde ein Redner mit einem extrem starken Laserpointer aus der Leinwand, auf die er zeigt, Löcher herausstanzen (siehe unten). Die bearbeiteten Schnittpräparate können asserviert werden, so dass man genau rekonstruieren kann, aus welchem Bereich die entnommenen Zellen stammen.

Wissenschaftliche Anwendungen

In der Forschung kommt die LMD seit über zehn Jahren zum Einsatz. So zeigte eine Münchner Arbeitsgruppe 2001, dass



Hirnschnitte vor und nach Mikrodissektion. Die Umrisse der interessierenden Zellareale werden manuell oder mit einer Bilderkennungssoftware markiert (links) und mit einem Laserstrahl abgetastet. Zurück bleiben entsprechend geformte Löcher (rechts).

¹Emmert-Buck et al. *Science* 1996; 274:998-1001

formalin-fixierte und paraffinierte Gewebeschnitte geeignet sind, die Expression krebsrelevanter Gene wie EGFR oder HER2/neu zu studieren: Hierfür schnitten sie jeweils exakt 50 Zellen aus und erhielten mittels qPCR gut vergleichbare Messergebnisse. Im selben Jahr identifizierten Forscher der Universität Tokio rund 200 fehlexprimierte Gene beim Kolorektalkarzinom mithilfe von DNA-Microarrays (Biochips). Dafür isolierten sie aus ein und demselben Patienten Tumorzellen und normale Darmmucosazellen und konnten dadurch die Messungen intraindividuell standardisieren.

Potenziale für die Routine

Die Zahl wissenschaftlicher Publikationen über den Einsatz von LMD wächst insbesondere in der Onkologie rasch an. Eine PubMed-Suche nach den Stichworten *cancer laser microdissection* liefert aktuell über 1.500 Treffer (Stand Sept. 2011), davon über 100 allein aus dem laufenden Jahr. Aus Sicht der Pathologie sind diese Grundlagenarbeiten von großem Wert; für die Anforderungen der Routinepathologie reicht dagegen die manuelle Makrodissektion von Paraffinschnitten oder die Verwendung gefrorenen Tumorgewebes zurzeit aus.

Je kleiner die eingesandte Gewebeprobe ist, umso schwieriger wird es aber, daraus reine Krebszellen zu gewinnen, da naturgemäß jeder Tumor aus tatsächlich entarteten wie auch unveränderten Zellen (bindegewebiges Stroma, Infiltrate von Entzündungszellen etc.) besteht. Zudem sind auch die malignen Zellgruppen in sich sehr heterogen, was eine standardisierte Analyse ohne LMD-Einsatz erschwert.

Individualisierte Therapie

In letzter Zeit wächst bei den Einsendern der Wunsch, jedem Patienten eine individuelle, eben „seinen“ Tumor betreffende Therapie anzubieten. Durch die Unter-


suchung genetischer Veränderungen wie HER2/neu beim Brustkrebs, EGFR beim Lungenkrebs oder KRAS beim Darmkrebs können gezielt bestimmte Therapien ausgewählt (oder ausgeschlossen) werden. Molekularpathologisch untersucht man in mikrodisezierten Proben Mutationen, Gen-Rearrangements sowie die Expressionsraten tumor-assoziiierter Gene mit dem Ziel, eine aussagekräftige Empfehlung zur individualisierten Krebstherapie (*targeted therapy*) geben zu können.

Was die häufig ins Feld geführte Untersuchung von Einzelzellen betrifft, so ist die LMD für die Routine (noch) nicht von Bedeutung. Hier liegt eine Domäne der molekularpathologischen Forschung, ganz besonders auf dem Gebiet der disseminierten Tumorzellen im Knochenmark. Diese lassen sich nur mit LMD wirklich gezielt gewinnen. Sollte die Untersuchung solcher Zellen in Zukunft Bedeutung in der Routinediagnostik erhalten, wäre die Technologie auch dort stärker im Rennen.

Wirtschaftlichkeit

Für die Mehrzahl der Pathologien, insbesondere in der niedergelassenen Praxis, lohnt sich allerdings die Anschaffung eines solchen Gerätes wegen der hohen Preise

und Wartungskosten für Laser und Softwareupdates nur selten. Außerdem benötigt man relativ viel Platz sowie mitunter einen schweren Spezieltisch aus Granit oder einen anderen erschütterungsfreien Arbeitsplatz, um eine fehlerfreie Funktion zu gewährleisten.

Für große pathologische Institute mit molekularbiologischer Abteilung, insbesondere an Universitäten und anderen Forschungseinrichtungen mit entsprechenden finanziellen Mitteln und Projekten, ist die Lasermikrodissektion schon heute von unbestreitbarem Nutzen; alle anderen sollten die Leistung bei Bedarf von extern beziehen und sich mit dem Kauf gedulden, bis die Geräte dank höherer Stückzahlen preisgünstiger werden. 



Dr. med. Gudrun Schlake
Institut für Pathologie und
Molekularpathologie, Gelsenkirchen
gs@pathoge.de

Ein Grundprinzip – vier Isolierungsverfahren

Systeme für die Lasermikrodissektion lassen sich in vier Typen einteilen. Das Grundprinzip ist stets dasselbe:

Ein Infrarot- oder Ultraviolett-Laser erzeugt einen Strahl, der durch ein Objektiv mit hoher numerischer Apertur auf einen Durchmesser von deutlich unter 1 µm gebündelt wird. Man markiert das interessierende Areal am Bildschirm durch eine geschlossene Linie, die der Laserstrahl anschließend computergesteuert abtastet. Durch die hohe lokale Lichtenergie wird das Areal aus dem Gewebeverband herausgetrennt.

Die Unterschiede zwischen den Systemen liegen in der Art, wie die Probe in das Untersuchungsgefäß gelangt: Bei Zeiss (S. 186) wird sie entgegen der Schwerkraft hochkapultiert, bei Leica (S. 187) fällt sie nach unten. MMI (in einigen Ländern vertrieben von Nikon und Olympus) verwendet spezielle Gefäße mit adhäsivem Deckel und Arcturus (in Deutschland vertreten durch Alpha Metrix) eine thermoplastische Membran; bei diesen beiden Systemen klebt die Probe also nach dem Heraustrennen an einer festen Unterlage.

gh