

Multifokale 2-Photonen-Laser-Scanning-Mikroskopie

Visualisierung zellulärer Makrostrukturen für das Tissue Engineering

JÖRG MARTINI, KATJA TÖNSING UND DARIO ANSELMETTI
EXPERIMENTELLE BIOPHYSIK UND ANGEWANDTE NANOWISSENSCHAFTEN,
UNIVERSITÄT BIELEFELD

Die hohe Morbidität an degenerativen, entzündlichen und traumatischen Bindegeweserkrankungen bei gleichzeitig nur eingeschränkten therapeutischen Möglichkeiten lassen einen enormen Bedarf für neue Ansätze zur Charakterisierung und Regeneration von Knorpel- und Knochengewebe (Tissue Engineering) erkennen.

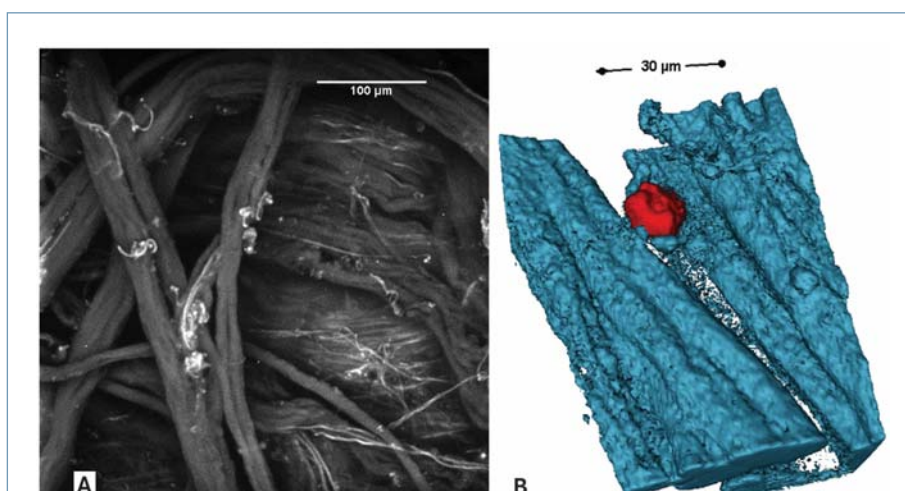
■ Eine erfolgreiche Behandlung von Verletzungen des menschlichen hyalinen Knieknorpels ist die membrangestützte Implantation autologer Chondrozyten^[1]. Autologe, *in vitro* expandierte Knorpelzellen werden dazu in eine dreidimensionale Stütz- und Bindematrix aus bioresorbierbaren Materialien wie Kollagen I/III-Membranen eingebettet und unter geeigneten Kulturbedingungen zur gewebespezifischen Ausdifferenzierung und Reifung des Gewebes gebracht und anschließend dem Patienten reimplantiert. Für eine erfolgreiche Therapie ist es von Vorteil, wenn die entscheidenden Eigenschaften der Knor-

pelzellen wie Proliferationsfähigkeit und Fähigkeit zur Bildung hyalinen Gelenknorpels (funktionelle Differenzierung) kontrolliert und an die individuellen Bedürfnisse des Patienten angepasst werden könnten, d. h. die spezielle Charakterisierung eines Knorpeltransplantates sollte schon während der Kultivierung möglich sein. Die 2-Photonen-Laser-Scanning-Mikroskopie (2PLSM)^[2, 3] ist beim heutigen Stand der Technik die einzige Technologie, die eine berührungslose und markierungsfreie Untersuchung ausgedehnter Zellverbände mit hoher dreidimensionaler Auflösung (etwa

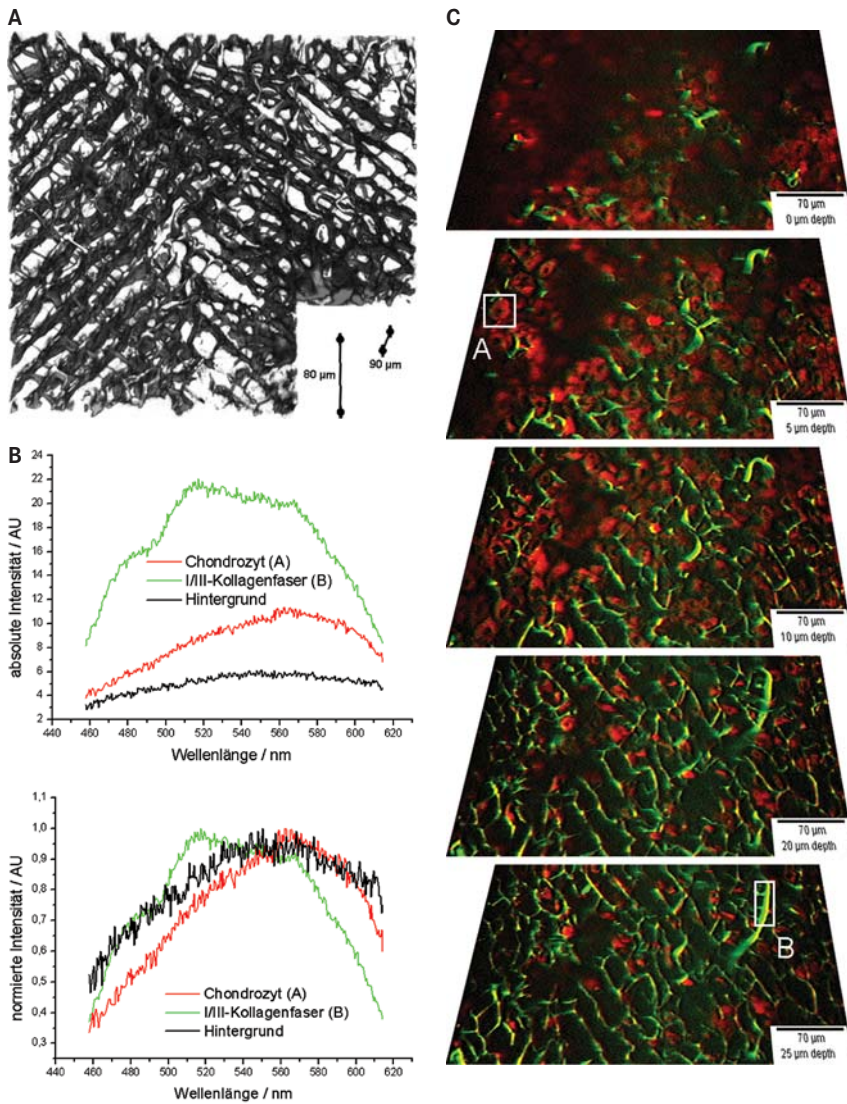
300 nm lateral und 1000 nm axial) ermöglicht. Der entscheidende Vorteil für die Untersuchung ausgedehnter Zellverbände ist die Fluoreszenzanregung mit Wellenlängen im nahinfraroten (NIR) Bereich von 700–1100 nm (entsprechend einem Wellenlängenbereich von 350–550 nm bei 1-Photonenanregung). Dies gewährleistet sowohl geringe Streuung und Absorption als auch niedrige Phototoxizität im Gewebe^[4], sodass tief liegende Probenebenen schädigungsfrei abgebildet werden können. Der optische Zugang zu stark streuenden biologischen Proben durch die 2PLSM hat über den Einsatz von Tissue-Engineering-Produkten hinaus, ein großes Potenzial auf vielen weiteren Gebieten der Biotechnologie und Medizin.

Multifokale 2-Photonen-Laser-Scanning-Mikroskopie (2PLSM)

2PLSM bietet durch die Verwendung von NIR-Anregungswellenlängen die Möglichkeit der Untersuchung tief in streuendem Gewebe, welche beispielsweise bei der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) aufgrund der Verwendung von ultravioletter oder sichtbarer Strahlung und sowie durch die notwendige Lochblende nicht gegeben sind. Der Wegfall der konfokalen Lochblende und damit der Detektion auch stark in der Probe gestreuter Fluoreszenz wird durch die intrinsische dreidimensionale Lokalisation der 2-Photonen Fluoreszenzanregung ermöglicht, die gleichzeitig auch mögliche Probenschädigungen stark reduziert. Um die Bildaufnahmezeit der 2PLSM, welche im Einzelstrahlmodus im Bereich der CLSM liegt, erheblich zu verringern, werden bei der multifokalen 2PLSM mehrere Foki parallel verwendet^[5]. Das hier eingesetzte TriMScope (LaVision BioTec) basiert auf einem Strahlteiler, der den ankommenden Laserstrahl in wahlweise 1,2,4,...,64 Teilstrahlen gleicher Intensität aufspaltet, die dann simultan in der Objektebene gerastert werden. Dadurch kann die auf die einzelnen Fokusregionen eingestrahlte Energie so gewählt werden, dass die Photoschädigung des biologischen Materials minimal ist, während gleichzeitig die (bis zu)



▲ **Abb. 1:** A, I/III-Kollagen-Fleecemembran: 2-Photonenanregung (810 nm, 64 Foki à 4.4 mW, 1 s Belichtungszeit) der nativen Fluoreszenz, Filter: HQ575/50, Maximalintensitätsprojektion von 240 optischen Schichten à 1 μm. B, Digitale Rekonstruktion eines Chondrozyten auf einer Kollagenfaser basierend auf 2-Photonen induzierter (820 nm, Einzelfokus, PMT-Detektion) nativer Fluoreszenz (HQ 525/50 und HQ 575/50 Emissionsfilter) und SHG (HQ 410/20 Emissionsfilter).



▲ **Abb. 2:** A, Voxeldarstellung der schwammartigen Kollagen-Membran basierend auf 2-Photonen induzierter (820 nm, Einzelfokus, PMT-Detektion) nativer Fluoreszenz, kein Emissionsfilter, Datensatz beinhaltet Bilder bis in eine Tiefe von 90 μm innerhalb der Probe. B, Emissionsspektren von I/III Kollagenfasern aus den schwammartigen Membranen erhalten durch 2-Photonenanregung (785 nm, 32 Foki à 5.5 mW, 650 ms Belichtungszeit), aufgenommen mit einem Prisma-basierten Eigenbauspektrometer. Die Spektren wurden aus Bereichen in Abbildung 2C aufgenommen, die deutlich als Kollagenfaser bzw. Chondrozyt zu identifizieren sind. Links: relative Intensität, rechts: normierte Intensität. C, Spektral entmischter Datensatz der dreidimensional aufgelösten nativen Fluoreszenzspektren (lineare Abhängigkeit der Spektren in Abbildung 2B, 2-Photonenanregung mit 32 Foki à 5.5 mW, 785 nm, 650 ms Belichtungszeit, Bereich A zeigt einen Chondrozyten, Bereich B zeigt eine Kollagenfaser.

64fache Fluoreszenzintensität generiert wird. Durch die so verbesserte Photonenstatistik eröffnet die multifokale 2-Photonen-Mikroskopie beispielsweise die Möglichkeit, dreidimensional aufgelöste Emissionsspektren nativer Fluoreszenzen (**Abb. 2B**) oder dynamische Vorgänge in Zellen auch über längere Zeitabschnitte zu beobachten.

Visualisierung extrazellulärer Strukturen: Chondrozyten auf Fleece-Kollagenmembranen

Um Gewebe *in vitro* herzustellen, müssen die jeweiligen Zellen auf einer natürlichen oder artifiziellen extrazellulären Matrix (Scaffold)

angesiedelt werden. Dazu werden beispielsweise I/III-Kollagen-Fleecemembranen, die mit autologen Chondrozyten besiedelt worden sind (**Abb. 1**), verwendet. **Abbildung 1A** zeigt deutlich die faserige Struktur der Kollagenmatrix. Bis zu 80 μm dicke, locker assoziierte Kollagenfasern bilden die obere Schicht (ca. 200 μm) dieser Kollagenmembran. Die Chondrozyten adhäreren an diesen Fasern und ein tieferes Einwandern in die Membran wird durch ein dichtes Netzwerk von dünnen regelmäßig angeordneten Fasern unterhalb dieser Schicht verhindert. Um native Langzeitstudien an den Chondrozyten durchführen zu können, ist es erforder-

lich sie auf den Kollagenfasern zu detektieren ohne dass sie angefärbt werden müssen. Zur optischen Differenzierung zwischen Chondrozyten und Kollagen bietet sich die Second-Harmonic-Generation (SHG) Mikroskopie als gute Kontrasttechnik an. SHG basiert auf einer Frequenzverdoppelung des eingestrahlt Lichts und ist spezifisch für nicht-centrosymmetrische Molekülstrukturen wie Kollagen^[6, 7]. Durch Kolo-kalisation der nativen Fluoreszenzemissions- und SHG-Signale des Kollagens können mithilfe von Emissionsfiltern die Chondrozyten von der Kollagenmatrix spektral getrennt werden (**Abb. 1B**).

Chondrozyten auf schwammartigen Kollagenmembranen

Die Viabilität von Chondrozyten auf schwammartigen Kollagenmembranen (**Abb. 2A**) ist durch die honigwabentartige Struktur, die den Zellen eine ausreichende Versorgung mit Kulturmedium ermöglicht, erhöht. Da diese schwammartigen Kollagenfasern kein SHG-Signal aufweisen, muss hier ein anderes Kontrastierungsverfahren zur Unterscheidung der Kollagenmembran von den Chondrozyten eingesetzt werden. Dafür werden dreidimensional aufgelöste Emissionsspektren (**Abb. 2B**) aufgenommen und die Methode der „spektralen Entmischung“ (spectral unmixing), also der Test auf lineare Abhängigkeit individueller Spektren von mehreren Referenzspektren, auf den gesamten Datensatz angewandt.

Abbildung 2C zeigt, dass mit dieser Methode die Chondrozyten von den Kollagenfasern separiert werden können. Die Chondrozyten befinden sich hauptsächlich an der Oberfläche der Stützmembran (bis ca. 30 μm), da ihr tieferes Einwandern aufgrund des zu geringen Röhrendurchmessers dieser Membran wahrscheinlich nicht möglich ist. Deshalb sind größere mittlere Röhrendurchmesser der Membran nötig, um eine für die erfolgreiche Knorpelregeneration funktionelle dreidimensionale Chondrozytenverteilung zu erreichen.

Kontrollmessungen an zunächst ungefärbten und anschließend mit den Farbstoffen Propidiumiodid und Syto 83 (tot/lebend Charakterisierung der Zellen) gefärbten identischen Probenregionen haben gezeigt, dass nicht nur eine Unterscheidung von Kollagenen und Zellen aufgrund der nativen Emissionsspektren möglich ist, sondern auch eine tot/lebend Charakterisierung dieser Zellen. Damit liefert also die multifokale 2PLSM

wichtige Erkenntnisse für die Optimierung der *in vitro*-Anzuchtbedingungen der hier untersuchten Tissue-Engineering-Produkte und erhält gleichzeitig ihre volle Verwendbarkeit, da die Untersuchungen auf jede Art der Markierung verzichtet und unter physiologischen Bedingungen durchgeführt werden kann. ■

Danksagung

Die Arbeiten wurden gefördert durch das Forschungsprojekt MeMo (13N8432) im Rahmen des Forschungsschwerpunkts Biophotonik I des Bundesministeriums für Forschung und Bildung (BMBF) und des VDI-Technologie-zentrums und durchgeführt in Zusammenarbeit mit den Projektpartnern IBA e. V. (Heiligenstadt) und LaVision BioTec (Bielefeld).

Literatur

- [1] Redman, S. N., Oldfield, S. F., Archer, C. W. (2005): Current strategies for articular cartilage repair. *European Cells and Materials* 9: 23–32.
- [2] Denk, W., Strickler, J. H., Webb, W. W. (1990): Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* 248: 73–76.
- [3] König, K. (2000): Multiphoton microscopy in life sciences. *Journal of Microscopy* 200: 83–104.
- [4] Cheong, W. F., Prael, S. A., Welch, A. J. (1990): A review of the optical properties of biological tissues. *IEEE J. Quantum Electron.* 26: 2166–2185.
- [5] Nielsen, T., Fricke, M., Hellweg, D., Andresen, P. (2001): High efficiency beam splitter for multifocal multiphoton microscopy. *Journal of Microscopy* 201: 368–376.
- [6] Campagnola, P. J., Loew, L. M. (2003): Second-harmonic generation imaging microscopy for visualizing biomolecular arrays in cells, tissues and organisms. *Nature Biotech.* 21: 1356–1360.
- [7] Zipfel, W. R., Williams, R. M., Christie, R., Nikitin, A. Y., Hyman, B. T., Webb, W. W. (2003): Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 7075–7080.



Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Dario Anselmetti¹
Dr. Katja Tönsing²
Dr. Jörg Martini³
Lehrstuhl für experimentelle
Biophysik und angewandte
Nanowissenschaften
Fakultät für Physik
Universität Bielefeld
Universitätsstraße 25
D-33615 Bielefeld
Tel.: 0521-106-6870
Fax: 0521-106-2959
dario.anselmetti@physik.uni-
bielefeld.de