

# Beispiele nanobiotechnologischer Ansätze in Grundlagenforschung und industrieller Anwendung.

Martin Oberringer<sup>1</sup>, Wolfgang Metzger<sup>2</sup>, Uwe Hartmann<sup>1</sup>  
1 Experimentalphysik, 2 Fresenius Hemocare Adsorber Technology

Die Nanobiotechnologie befasst sich mit Objekten, deren Abmessungen millionenfach kleiner sind als diejenigen typischer Gebrauchsgegenstände. Diese Objekte sind damit auch noch etwa tausendfach kleiner als diejenigen von Mikrosystem-Bauelementen. Durch die Vereinigung der Möglichkeiten, die physikalische Gesetze, chemische Stoffeigenschaften und biologische Prinzipien bieten, und durch die äußerst starke Verknüpfung anwendungsrelevanter Grundlagenforschung mit industriellen Perspektiven soll das Ziel erreicht werden, sowohl neue Ansätze in der Nanoanalytik als auch in der Nanofabrikation zu etablieren. Dabei sollen Baupläne und Ordnungsprinzipien der Natur genutzt werden, was zunächst die Visualisierung der biologischen Strukturen erfordert.

Was sind typische Strukturen, deren nanoanalytische Charakterisierung sich tatsächlich lohnt? Zum einen können Fragestellungen aus der Bionik, bei denen es beispielsweise um die Charakterisierung von Gerüststrukturen verschiedener biologischer Bauelemente geht, direkt adaptiert werden: Eine Beschreibung der Strukturen ist nicht nur - wie bisher üblich - im mm- und  $\mu\text{m}$ -Maßstab möglich, sondern kann bis in den nm-Maßstab erfolgen. Geht man noch eine Ebene tiefer im Bauplan der Organismen, nämlich auf die Zellebene, so ergeben sich Fragestellungen, die zum einen die Zelloberfläche, insbesondere aber auch die Interaktion von Zellen über ihre Oberflächen betreffen. Die Charakterisierung der hierbei beteiligten Proteine, die eine typische Größe

Die stetige Fortschreitung der Miniaturisierung während der letzten Jahre hat unter anderem dazu geführt, dass heute qualitativ hervorragende Werkzeuge in großer Vielfalt zur Verfügung stehen, die zum einen geeignet sind, strukturelle Details im Bereich von einigen wenigen Nanometern (nm) abzubilden, zum anderen aber auch in der Lage sind, Strukturen dieser Größenordnung zu manipulieren. Der interdisziplinäre Austausch von Erkenntnissen aus Physik, Chemie, Medizin, Pharmazie und Biologie, der in der Nanobiotechnologie mündet, ermöglicht erst die Nutzung dieser Werkzeuge in molekularbiologischen, bioanalytischen und biotechnologischen Ansätzen.

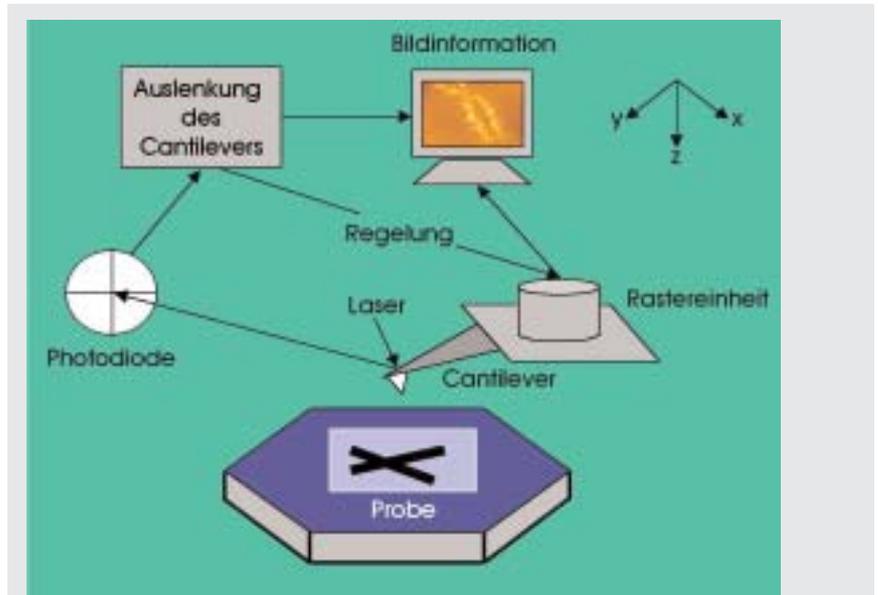


Abb. 1: Schematischer Aufbau eines Rasterkraftmikroskops (AFM)

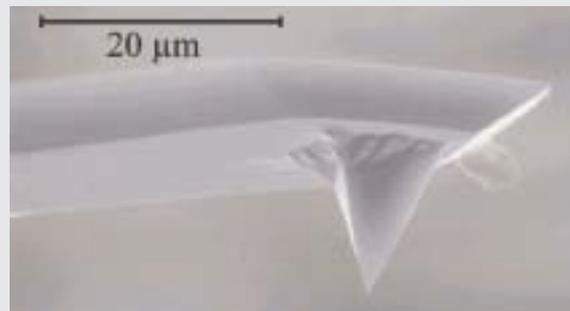


Abb. 2: AFM-Cantilever mit pyramidalen Spitze

von einigen wenigen bis zu mehreren hundert nm haben, ist ein wesentliches Ziel. Damit können auch neue Erkenntnisse über die Interaktion von Zellen, als ein Beispiel seien hier Blutzellen ge-

nannt, mit künstlichen Oberflächen gewonnen werden. Zum anderen sollen mit nanoanalytischen Methoden auch Zellorganellen - funktionelle Strukturen im Innern einer Zelle, deren Bestandteile teilweise nur wenige nm groß sind - beschrieben werden. Wiederum eine Ebene tiefer im Bauplan warten unsere Erbsubstanz DNS und die in ihr noch immer größtenteils verborgenen Gene darauf, sowohl auf chromosomaler als auch auf Doppel- und Einzelstrangebene analysiert zu werden. Ein DNS-Doppelstrang hat eine typische Breite von ca. 2nm. Im Folgenden werden die Instrumente vorgestellt, die

derzeit für die nanoanalytische Charakterisierung biologischer Bausteine zur Verfügung stehen.

### Die Rastersondenmikroskopie

Zu den wichtigsten Werkzeugen gehört die Gruppe der Rastersondenmikroskope. Bedeutende Vertreter sind neben dem Rastertunnelmikroskop (engl.: Scanning Tunneling Microscope, STM), für dessen Entwicklung Binnig und Rohrer 1986 den Nobelpreis für Physik erhielten, das Rasterkraftmikroskop (engl.: Atomic Force Microscope, AFM) und das optische Rasternahfeldmikroskop (engl.: Scanning Near-field Optical Microscope, SNOM). Während das STM den Tunnelstrom zwischen Probe und Sondenspitze misst, und somit sehr gut für die Abbildung leitender Strukturen geeignet ist, können mit dem AFM auch nichtleitende Objekte abgebildet werden [1, 2, 3].

Die Funktionsweise eines AFM (siehe Abb. 1) beruht auf der Messung der anziehenden und abstoßenden Kräfte

zwischen Probe und Sondenspitze, die im Bereich von wenigen Piconewton (pN) bis zu ein paar Nanonewton (nN) liegen. Die auftretenden Kräfte werden dadurch registriert, dass die Verbiegung einer Blattfeder (engl.: Cantilever), an der die eigentliche Messsonde befestigt ist, gemessen wird. Dies geschieht indirekt über die Ablenkung eines auf die Sondenspitze fokussierten Laserstrahls, der auf eine Photodiode reflektiert wird. Die Position dieses Strahls wird in eine Spannungsänderung umgewandelt, die dazu dient, zusammen mit der x- und der y-Position die z-Position der Sondenspitze anzugeben. Als Resultat erhält man dann ein dreidimensionales Bild der Oberfläche. Das Auflösungsvermögen ist von mehreren Faktoren abhängig. Dazu zählen die Eigenschaften der Probenoberfläche, die Größe der Sondenspitze, deren Radius gewöhnlich zwischen 10nm und 100nm liegt (siehe Abb. 2), die Stärke der Wechselwirkung und die Umgebungsbedingungen können als die wichtigsten genannt werden. Die maximale laterale Auflösung liegt zwischen 0,5nm

und 1nm, wobei im Ultrahochvakuum sogar atomare Auflösung erreichbar ist.

Im Gegensatz zum AFM wird beim SNOM (Abb. 3) eine Lichtquelle über die Oberfläche der Probe gerastert und nachfolgend wird das von einem angeregten Fluoreszenzfarbstoff emittierte Licht detektiert. Die Lichtquelle besteht aus einer spitz ausgezogenen und mit Aluminium bedampften Glasfaser, an deren Ende eine Apertur mit einem Durchmesser von ca. 50nm entsteht. Das Licht, das zuvor mit einem Argon-Ionen-Laser (Lichtwellenlänge: 488nm) eingekoppelt wurde, tritt dort aus. Fluoreszierende Objekte und Stoffe, in unserem Fall Fluorochrome, werden dadurch im Nahfeld angeregt und können mit einer Auflösung, die unterhalb der Wellenlänge des Lichts liegt, abgebildet werden. Das im Nahfeld reflektierte Licht wird dabei von Photodioden eingefangen, denen zur Generierung eines Impulses ein einziges Photon ausreicht. Während der rasterförmigen Bewegung der Sonde wird diese mit Hilfe eines Quarzes in laterale Schwingungen versetzt, welche dann unmittelbar über der Probe (50nm) eine Dämpfung erfahren. Hierbei erhält man zusätzliche Information über die Topographie der Probe [4].

### Einsatz der Rastersondenmikroskopie bei humangenetischen Fragestellungen

Die Humangenetik befasst sich im allgemeinen mit der Identifikation und der Charakterisierung der Eigenschaften und der Struktur unserer Erbsubstanz, der Desoxyribonukleinsäure (DNS). Die hierfür verwendeten Methoden können dahingehend unterschieden werden, in welchem Zustand die DNS analysiert wird. Abhängig vom Kondensationsgrad der DNS liegt sie im Interphasenkern einer Zelle im Extremfall in decondensierter Form vor, wobei einzelne Abschnitte im Zuge eines Hybridisierungsexperiments zugänglich und sichtbar gemacht werden können.

In der Metaphase der Mitose liegt die DNS einer Zelle maximal kondensiert in Form von 46 Chromosomen vor. Diese Form wird, im wesentlichen durch Bänderungstechniken unterstützt, zur Karyotypisierung genutzt. In der Folge können strukturelle Abweichungen der Chromosomen vom gesunden Karyotyp identifiziert werden.

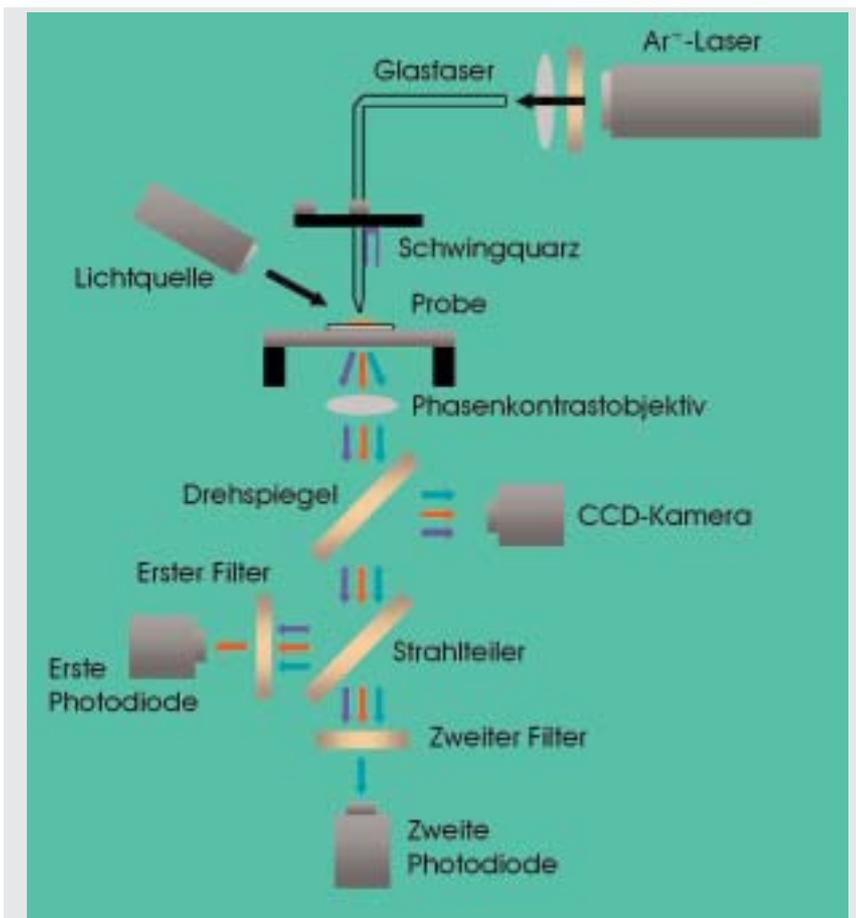


Abb. 3: Schematischer Aufbau eines Optischen Rasternahfeldmikroskops (SNOM)

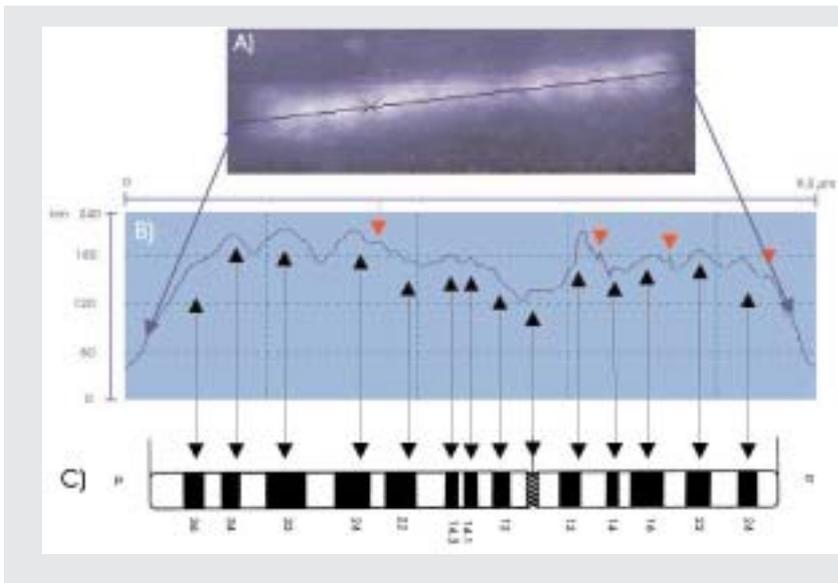


Abb. 4: Vergleich optischer und rasterkraftmikroskopischer Informationen von Chromosom 2

Ein weiterer Ansatz, bei dem die DNS nicht mehr, wie oben beschrieben, indirekt oder direkt visualisiert wird, besteht in der Anwendung verschiedenartigster molekularbiologischer Techniken. Sie führen zur Identifikation von Mutationen auf der Ebene von einzelnen DNS-Strängen, die mit herkömmlichen mikroskopischen Verfahren nicht mehr visualisierbar sind.

Ein Hauptaugenmerk der Humangenetik ist auf die Optimierung molekularzytogenetischer Methoden gerichtet, um neue diagnostische Verfahren zu entwickeln. Eine Vielzahl diagnostischer Techniken wird dazu genutzt, genetische Auffälligkeiten zu einem möglichst frühen Zeitpunkt zu identifizieren. Sie finden ihre Anwendung in der Pränataldiagnostik ebenso wie in der Tumordiagnostik, werden aber auch zur Erkennung von Erbkrankheiten beim Erwachsenen herangezogen.

Die GTG-Bänderung von Metaphasechromosomen und die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) sind zwei der zentralsten Techniken. Beide gehören zum diagnostischen Standardrepertoire, besitzen jedoch das Manko, dass ihre Auswertung auf der limitierten Auflösung konventioneller Mikroskope basiert. Gleiches gilt für Verfahren der Mikrodissektion und -extraktion, bei denen chromosomale DNS für verschiedene „downstream-Anwendungen“ gewonnen wird.

Die Analyse von routinemäßigen Präparationen GTG-gebänderter Chromosomen mit rasterkraftmikroskopischen Verfahren macht deutlich, dass die

Messung topographischer Eigenschaften Informationen liefert, die in lichtmikroskopischen Abbildungen nicht vorhanden sind (Abb. 4) [5]. So sind zum einen die bekannten positiven, im optischen Bild dunklen Banden des Chromosoms 2 (Standard-ISCN-Bänderung in Abb. 4C) durch eine deutliche Erhöhung mit Maxima bei etwa 210nm charakterisiert (Höhenprofil in Abb. 4B). Die zusätzliche Information besteht darin, dass konventionell dunkle Banden intern mehrere unterschiedliche Höhenmaxima zeigen, verdeutlicht durch die roten Pfeile. Höhenunterschiede innerhalb der Bande liegen im Bereich von wenigen 10nm.

Sollte die rasterkraftmikroskopisch ermittelte Topographie eine reproduzierbare Differenzierung von unterschiedlichen Peaks innerhalb dunkler Banden bei allen 46 Chromosomen zulassen, kann an die Etablierung eines Standards, ähnlich dem des ISCN, gedacht werden. Danach ist die Wertigkeit der neuen Methode als diagnostisches Kriterium zu ermitteln. Die hohe Bandenzahl, die man vom konventionellen „high-resolution-banding“ her kennt, wäre mit diesem Verfahren bereits an relativ hoch kondensierten Chromosomen zu ermitteln, was große präparative Vorteile hätte.

Auch an Chromosomen, bei denen zuvor mittels FISH bestimmte DNS-Bereiche fluoreszenz-markiert wurden, kann mit dem SNOM deutlich mehr Information gewonnen werden, als es die konventionelle Technik der Fluoreszenzmikroskopie erlaubt. Es ist möglich,

simultan die Topographie und die Fluoreszenzintensität eines Areals zu detektieren, wobei die Fluoreszenzdetektion prinzipiell bis hin zum Nachweis von einzelnen Photonen möglich ist. Anhand Abbildung 5 ist deutlich zu erkennen, dass auch schwache Fluoreszenzen (FITC), die aus einer geringen Anzahl gebundener Sondenmoleküle der verwendeten Zentromersonde resultieren, mit dem SNOM detektiert werden können. Diese Methode der Detektion bietet also im Besonderen dann große Vorteile, wenn die Notwendigkeit besteht, „single-copy-Bereiche“ mit schwacher Intensität der Sonde nachzuweisen.

Neben den Möglichkeiten der Abbildung von Strukturen im Nanometermaßstab bieten sowohl die AFM- als auch die SNOM-Technik verschiedene Möglichkeiten der Manipulation an Chromosomen [6]. Mit speziell angefertigten Spitzen können einzelne Areale isoliert und extrahiert werden. Abbildung 6 zeigt DNS-leere chromosomale Bereiche mit Kantenlängen von etwa 250nm, die mit Hilfe einer AFM-Spitze und dem Einsatz unterschiedlich starker Kräfte erzeugt wurden. Die DNS-Menge, die auf diese Art im Folgenden extrahiert werden kann und weiteren Anwendungen zur Verfügung steht, ist um ein Vielfaches kleiner und somit weitaus sequenzspezifischer als man das von herkömmlichen Piezogestützten Mikroextraktionsverfahren kennt.

Grundsätzlich kann man sagen, dass die bestehenden molekularbiologischen

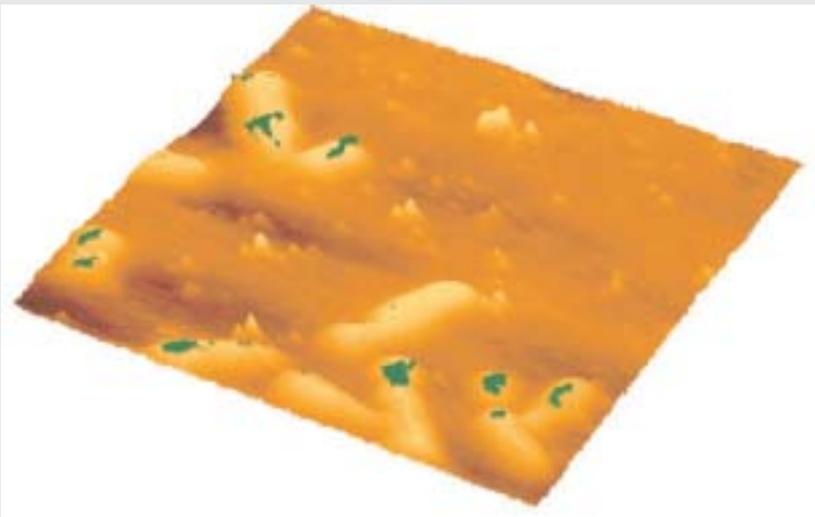


Abb. 5: Überlagerte Fluoreszenz-(grün) und Topographie-Abbildung (gelb) von Chromosomen mittels SNOM ( $25\mu\text{m} \times 25\mu\text{m}$ )

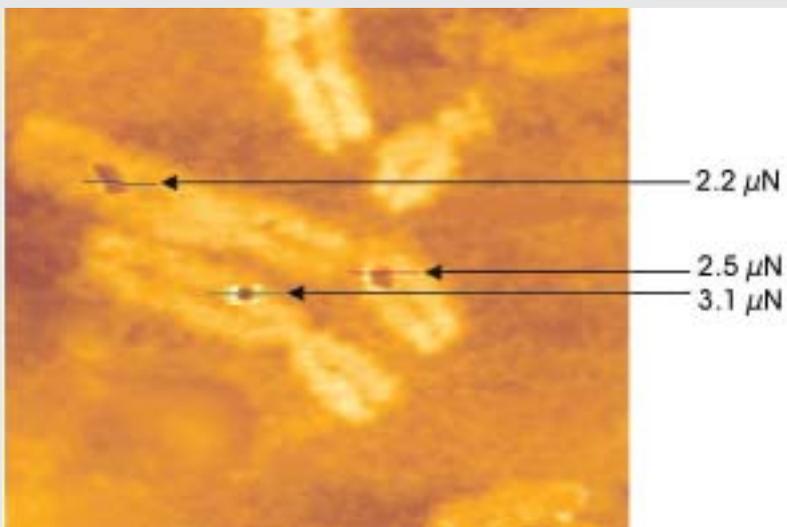


Abb. 6: Nanoextraktion ( $10\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$ )

Methoden noch weiter an die Rastersondenverfahren angepasst werden müssen. Am Ende der Entwicklung von Kombinationsverfahren aus humangenetisch geprägter Molekularbiologie und den Rastersondenverfahren steht die Vision, eine DNS-Sequenzierung direkt am Chromosom, also in situ, durchführen zu können.

### DNS als Konstruktionselement?

Eine weitere Vision besteht darin, DNS-Stränge als Bauelemente einzusetzen. Mögliche Anwendungen solcher definierter Bausteine könnten z.B. im Bereich der Elektronik liegen: Es scheint in Zukunft durchaus möglich zu sein, DNS-Stränge zu nutzen, um Drähte

bzw. Leiterbahnen von Mikrochips herzustellen. Diese hätten einen Durchmesser von nur noch etwa 2nm. Vergleicht man dies mit Leiterbahnen heutiger Mikrochips, die einen Durchmesser von etwa 100nm haben, so könnte die Verwendung von DNS-Elementen einen großen Vorteil bieten.

Dies und auch die visionäre Vorstellung, DNS als Transistor zu verwenden, setzt jedoch zunächst voraus, dass DNS-Stränge überhaupt eine Leitfähigkeit besitzen, die für solche Anwendungen geeignet sind.

Doch wie sind Leitfähigkeitsmessungen in diesem Maßstab zu realisieren? Bisher ist es erst rudimentär gelungen, den elektrischen Widerstand einzelner DNS-Stränge als Funktion der Länge des Stranges zu messen. Die wichtigste Voraussetzung für eine solche Messung ist die Fixierung des Stranges zwischen zwei Elektroden. Hierfür bedient man sich verschiedener Techniken, von denen eine darin besteht, den Strang über Linkermoleküle chemisch an den gewünschten Stellen zu fixieren. Eine weitere Technik konnte kürzlich von unserer Gruppe aufgezeigt werden: es handelt sich dabei um eine Kombination aus einer biochemischen Methode, dem sogenannten molekularen Kämmen (engl.: molecular combing) der DNS mit der anschließenden Nanomanipulation der Stränge mit der Sonde eines AFM. Abbildung 7 zeigt AFM-Aufnahmen von ungekämmten DNS-Strängen (A) und von DNS, die gekämmt wurde (B). Die Modifizierung und das Verschieben oder Durchtrennen der Stränge ist mit dem AFM danach ebenfalls noch möglich (C) [7].

### Einsatz der Rastersondenmikroskopie zur Optimierung biokompatibler und biologisch aktiver Materialien

Seit Herbst 2000 existiert eine Kooperation mit der Fresenius HemoCare Adsorber Technology GmbH im Rahmen des BMBF-Projektes FKZ 13N7867. Die Fresenius HemoCare Adsorber Technology Deutschland GmbH entwickelt, produziert und vertreibt weltweit Produkte zur extrakorporalen Apherese. Dabei handelt es sich um Therapie-Systeme, die aus dem Blut oder dem Plasma des Patienten selektiv pathogene Moleküle entfernen (Affinitätschro-



**Prof. Dr. Uwe Hartmann**, Studium der Physik und 1986 Promotion an der Universität Münster; 1992 Habilitation für Experimentalphysik an der Universität Giessen; seit 1993 Professur für Experimentalphysik an der Universität des Saarlandes, Saarbrücken; 1998 Gewinner der Philip Morris Preises; derzeitige Forschungsschwerpunkte liegen im Bereich der Rastersondenmikroskopie und der Nanotechnologie.

matographie). Im Gegensatz zur konventionellen medikamentösen Therapie ist die Apherese frei von Langzeitnebenwirkungen, da bei der Behandlung keine weiteren kritischen Substanzen in den Körper eingebracht werden, sondern das pathogene Molekül mit einer hohen Selektivität aus dem Körper entfernt wird. Während einer Behandlung wird das Patientenblut aus einer Armvene im Adsorber prozessiert und das gereinigte Blut anschließend wieder dem Patienten über die andere Armvene reinfundiert. Überwachung und Aufrechterhaltung des extrakorporalen Kreislaufes wird durch das Hämodsorptionsgerät 4008 ADS gewährleistet: Neben Pumpen zur Aufrechterhaltung des Blutflusses und der Gewährleistung einer konstanten Zitrat-Antikoagulation verfügt das Gerät über Sicherheitssysteme wie Drucksensoren und Luftdetektoren. In Abbildung 8 ist der extrakorporale Kreislauf schematisch dargestellt; Abbildung 9 zeigt das Hämodsorptionsgerät 4008 ADS.

Kernstück des Apherese-Systems ist der eigentliche Adsorber. Dieser besteht aus einem Kunststoffgehäuse, welches mit sphärischen, porösen Methacrylat-Beads ( $\varnothing$  ca. 150 $\mu$ m, Porenradius ca. 40nm) befüllt ist. Entsprechend der Patientensituation sind verschiedene Adsorbergrößen erhältlich. Je nach Indikationsstellung wird ein spezieller Ligand an der Matrix immobilisiert (Beschichtung oder Kopplung). Der Ligand ist ein Molekül, welches eine hohe Affinität zum pathogenen Molekül besitzt, so dass dieses während der Adsorberpassage selektiv aus dem Patientenblut oder Patientenplasma entfernt werden kann. Zur Zeit hat Fresenius 3 Adsorber im Markt (Abb. 10): DALI<sup>®</sup> [8, 9, 10] zur Behandlung der familiären Hypercholesterinämie, PROSORBA<sup>®</sup> [11, 12] für die Indikation rheumatoider Arthritis und Immunosorba<sup>®</sup> zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen wie Hemmkörper Hämophilie A oder Guillain Barré Syndrom. MATISSE<sup>®</sup> [13] zur Behandlung schwerer Formen der Sepsis durch gram-negative Bakterien befindet sich zur Zeit noch in der klinischen Prüfung. Als Ligand kommen chemische Verbindungen aber auch Proteine in Frage. Bei einer Unverträglichkeit des Liganden mit Blutzellen weicht das Flußschema von Abbildung 8 ab: In diesem Fall kann nur das Blutplasma prozessiert werden, was durch einen vorgeschalteten Zellsepa-

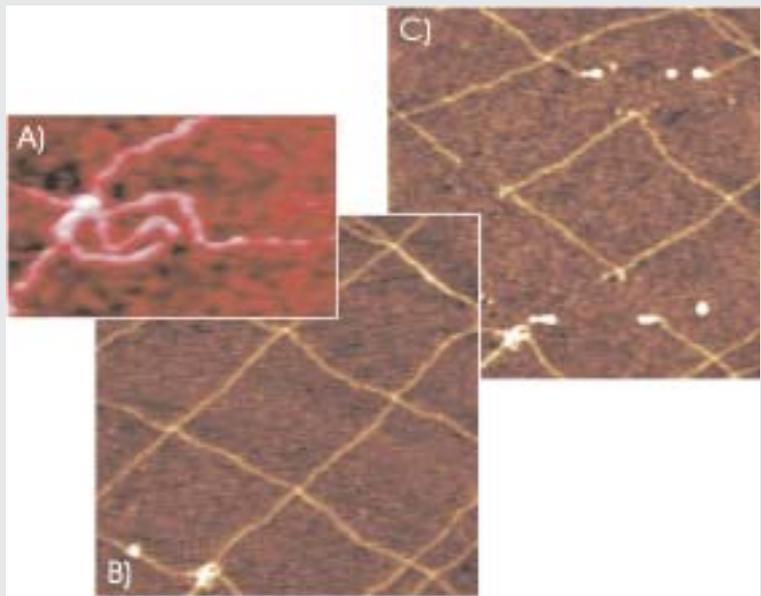


Abb. 7: AFM-Abbildungen von DNS-Doppelsträngen

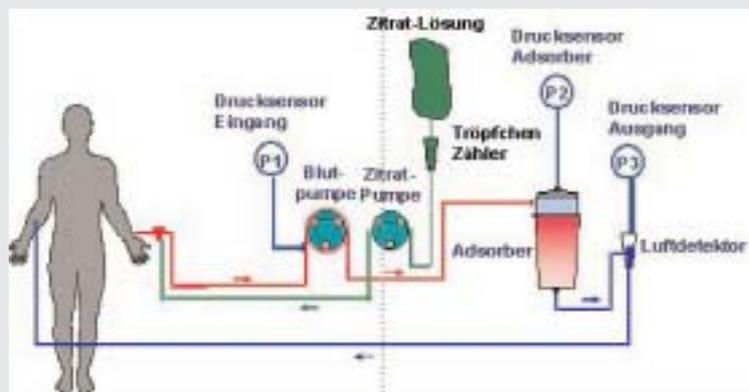


Abb. 8: Flußschema des extrakorporalen Blutkreislaufs der Apherese



Abb. 9: Hämodsorptionsgerät 4008 ADS

rator oder Plasmafilter gewonnen werden muss.

Der Erfolg der Ligandenkopplung wurde bislang nur durch *in-vitro*-Blutversuche untersucht, wobei die Abläufe einer Apherese-Behandlung im Labor simuliert werden. Hierzu wird eine kleine Menge des zu untersuchenden Adsorbens in kleine Labor-Chromatographie-Säulen eingefüllt und über entsprechende Schlauchsysteme an Labor-Blutpumpen, wie sie auch im Hämadsorptionsgerät 4008 ADS eingesetzt werden, angeschlossen. Das Adsorbens wird zunächst mit isotonischer Kochsalzlösung aufgeschüttelt und mit einem hohen Blutfuß „gepackt“, um eine möglichst dichte und homogene Kugelpackung zu erreichen und nachfolgend mit einer speziellen Elektrolytlösung behandelt. Nach dieser Vorbereitung kann mit dem eigentlichen Blutversuch begonnen werden, indem das antikoagulierte

**Dr. Martin Oberringer**, Studium der Biologie an der Universität des Saarlandes, Saarbrücken; 1999 Promotion am Institut für Humangenetik und in der Chirurgischen Klinik an der Universität des Saarlandes, Homburg, über die Molekularbiologie menschlicher Wunden; seit 1999 Mitarbeiter am Institut für Experimentalphysik, Universität des Saarlandes, Saarbrücken; Forschungsschwerpunkte liegen im Bereich der Rastersondenmikroskopie an biologischen Proben.



Vollblut des Spenders über die Säule geleitet und nach der Säulenpassage in mehreren Fraktionen gesammelt wird, die dann je nach Fragestellung analysiert werden können. Für die Entwicklung neuer Apherese-Systeme, aber auch im Zuge der Qualitätskontrolle der laufenden Produktion ist die Frage nach der Kapazität des Adsorbens, also wieviel von dem abzusenkenden pathogenen Molekül bezogen auf die Ausgangskonzentration in den einzelnen Fraktionen noch vorhanden ist, von höchster Priorität. Weiterhin lassen sich

über die Analyse der Blutbilder von Ausgangsblut und der einzelnen Fraktionen Rückschlüsse auf das Verhalten der Blutzellen während der Adsorberpassage ziehen: Bleibt der Hämatokrit konstant? Werden Thrombocyten reduziert? Ändert sich die Zahl der Weißen Blutzellen und wenn ja, welche Populationen sind davon betroffen?

Es wurden verschiedene Variationen des Versuches etabliert, die auf spezielle Fragen eine Antwort geben sollen. So können mit einem abgewandelten Versuchsdesign die Bedingungen einer Apherese-Behandlung (Rückvermischungprozessierten Blutes mit Reservoir) im Labor simuliert werden, andere Modifikationen wurden eingeführt, um spezielle Hämokompatibilitätsparameter *in-vitro* untersuchen zu können (z.B. Aktivierung von Blutzellen, Aktivierung des Komplementsystems, Status der plasmatischen Gerinnung).

Allen Blutversuchen gemein ist jedoch, dass immer nur eine Reaktion des Blutes auf den Kontakt mit artifiziellen Oberflächen und Materialien beobachtet werden kann. Soll im Rahmen einer Produkt-Entwicklung der Erfolg eines abgewandelten oder neu eingefügten Prozessschrittes untersucht werden, konnten bisher immer nur die Ergebnisse der Blutversuche diskutiert werden, die dann indirekt eine Aussage über den Beschichtungserfolg lieferten. Die Heterogenität des Spenderblutes führt zu einer zusätzlichen Komplikation: Unterschiedliche Ausgangskonzentrationen an Blutzellen oder an dem interessierenden pathogenen Molekül haben einen erheblichen Einfluss auf das Versuchsergebnis; genetische Polymorphismen müssen in Betracht gezogen werden; von Spender zu Spender sich unterscheidende präanalytische Aktivierungen können bei mehrfacher Durchführung des Blutversuchs stark voneinander abweichende Absenkungen der Blutzellen über die Versuchsdauer mit sich bringen; der Ge-



Abb. 10: Adsorberkartuschen: links DALI<sup>®</sup>, rechts PROSORBA<sup>®</sup>

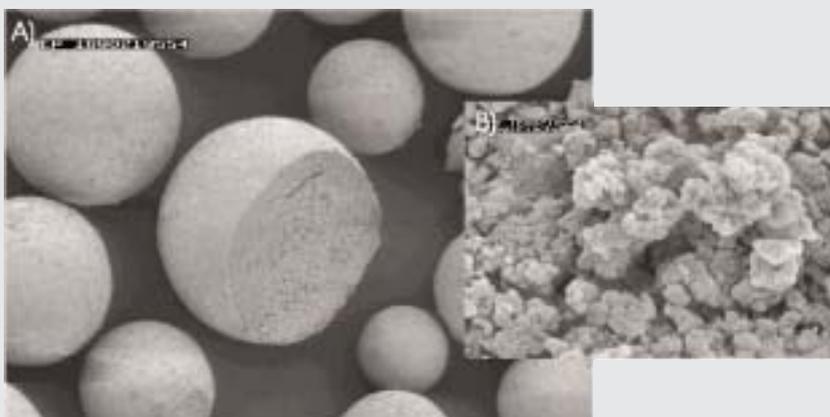


Abb. 11: REM-Aufnahme: Methacrylat-Beads. A: x200; B: x30.000

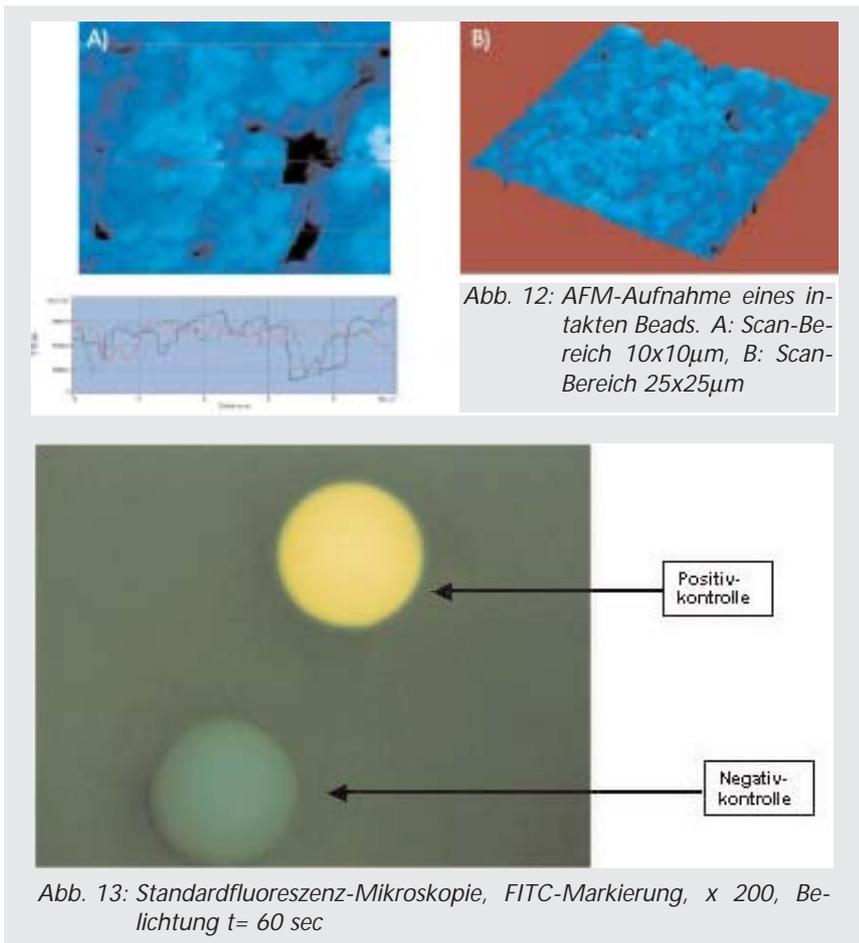


Abb. 12: AFM-Aufnahme eines intakten Beads. A: Scan-Bereich 10x10 $\mu$ m, B: Scan-Bereich 25x25 $\mu$ m

Abb. 13: Standardfluoreszenz-Mikroskopie, FITC-Markierung, x 200, Belichtung t= 60 sec

sundheitszustand des Spenders spielt eine große Rolle für das Versuchsergebnis: So kann ein latenter Infekt zu einem abweichenden Aktivierungsverhalten der Blutzellen führen. Ebenso kann eine Medikation (z.B. Acetylsalicylsäure als irreversibler Inhibitor der Thrombozytenfunktion) einen drastischen Einfluss auf das Versuchsergebnis nehmen. Durch eine genügend große Anzahl von Versuchswiederholungen lässt sich der Einfluss der beschriebenen Störgrößen zwar verringern, doch kann über den Erfolg einer Beschichtung nur *indirekt* eine Aussage gemacht werden. Durch den Einsatz des SNOM eröffnet sich der Fresenius HemoCare Adsorber Technology erstmals die Möglichkeit, den Erfolg der Beschichtung durch Visualisierung *direkt* sichtbar zu machen.

Die Methacrylat-Matrix wird vor dem Einsatz in der Produktion routinemäßig im Rasterelektronenmikroskop (REM) untersucht. Die Abbildung 11 zeigt beispielhaft das Ergebnis einer REM-Analyse.

Die Darstellung der Methacrylatbeads mittels AFM zur weiteren physikali-

schen Charakterisierung gelang wegen der Tiefe einiger Poren nur mit besonderen Sonden. In Abbildung 12 sind die Ergebnisse der AFM-Untersuchungen dargestellt. Die poröse Struktur der Bead-Oberfläche ist in den AFM-Aufnahmen deutlich zu sehen. Aus den Profilen der Abbildung 12 geht hervor, dass die Porentiefe mindestens 2 $\mu$ m beträgt, wobei die Messung allerdings durch die Spezifikation der AFM-Spitze beschränkt wird.

Das Hauptaugenmerk liegt auf der Darstellung von Ligand und pathogenem Molekül an der Adsorbermatrix. Als Fluorophor wurde Fluoresceinisothiocyanat (FITC) ausgewählt, da seine reaktive Isothiocyanatgruppe mit dem

aminogruppenhaltigen Liganden kovalente Bindungen eingehen kann.

In ersten Färbeversuchen wurden intakte Beads im konventionellen Fluoreszenzmikroskop untersucht. Als Negativkontrolle dienten hydroxylgruppenhaltige Beads, als Positivkontrolle aminogruppenhaltige Beads (Abb. 13). Da die Präparation intakter Beads einige technische Schwierigkeit mit sich brachte, wurde die Färbemethode auf Semi-Dünnschnitte übertragen. Das Einbetten der Beads in Epoxyharz Araldit 502<sup>®</sup> und die Mikrotomschnitte (Diamantmesser) wurden von Dr. Michael Laue, Anatomie & Zellbiologie, Elektronenmikroskopie, Universität des Saarlandes, Homburg, durchgeführt. Da die Schnitte nach Aufbringen auf den Objektträger noch fast komplett vom Einbettmittel umgeben sind (Abb. 14 A und C) ist nur eine unzureichende Wechselwirkung mit FITC möglich. Hier hat sich die Inkubation der Schnitte in Natriumethanolat als sehr effektive Methode zur sekundären Entfernung des Araldits aus den Schnitten erwiesen (Abb. 14 B) [14, 15].

In den Abbildungen 14 A und B zeigen sich folgende Bereiche (von links nach rechts): Bead, Araldit, Objektträger. In Abbildung 14 B ist deutlich die freigeätzte Bead-Oberfläche zu sehen, die sich topographisch über das basal noch vorhandene Araldit erhebt. Im Gegensatz dazu scheinen die unterschiedlichen Bereiche in Abbildung 14 A keine topographischen Unterschiede aufzuweisen. Dies wird bei stärkerer Vergrößerung in Abbildung 14 C noch deutlicher: Die Bead-Matrix erhebt sich nicht über die Araldit-Ebene und die stark poröse Beadstruktur ist zum großen Teil vom Araldit verklebt.

Erste Färbeversuche der freigeätzten Semi-Dünnschnitten konnten zeigen, dass Positiv- (nur Aminogruppen) und Negativkontrolle (nur Hydroxygruppen) reproduzierbar fluoreszenzmarkiert werden können (Abb. 15).



**Dipl. Biol. Wolfgang Metzger**, Studium der Biologie an der Universität des Saarlandes, Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Rita Bernhardt 1999, seit 1999 wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Forschungs- und Entwicklungsabteilung der Fresenius HemoCare Adsorber Technology Deutschland GmbH, St. Wendel.

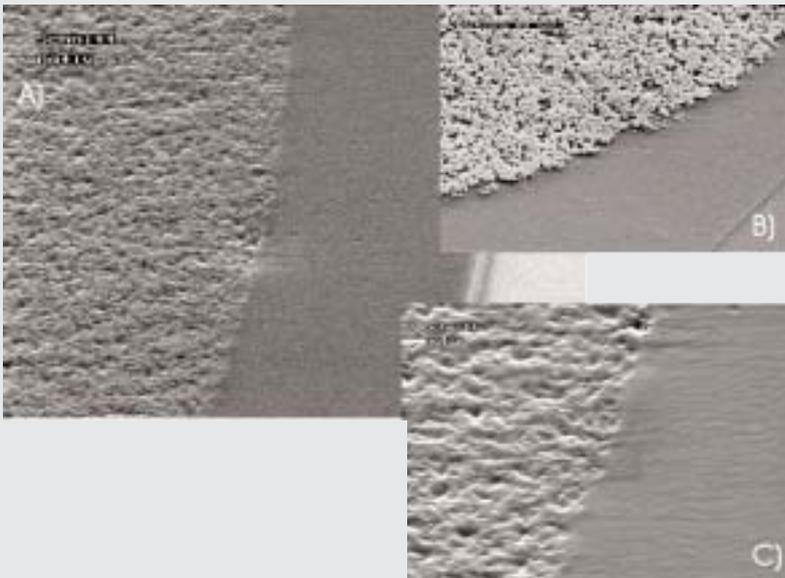


Abb. 14: REM-Aufnahme, Semi-Dünnschnitt,  $D = 500\text{nm}$ . A: unbehandelt,  $\times 3000$ ; B: Inkubation in Natriumethanolat  $T = 60\text{ sec}$ ,  $\times 5000$ ; C: unbehandelt,  $\times 10.000$

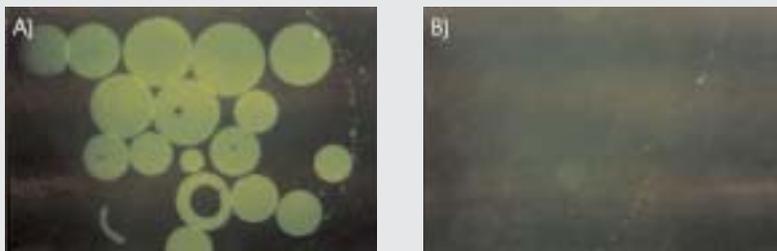


Abb. 15: Semi-Dünnschnitte,  $D = 500\text{nm}$ , FITC-Markierung,  $c = 0,08\text{ mg/ml}$ ,  $\times 100$ , Belichtung  $T = 15\text{sec}$ . A: Positivkontrolle; B: Negativkontrolle

## Ausblick

Im Weiteren sollen in der genannten Kooperation die fluoreszenzmarkierten Schnitte im SNOM untersucht werden. Hierzu müssen die Fluoreszenzintensitäten den Gegebenheiten des SNOM angepasst werden. Im Anschluss daran soll versucht werden, mit Hilfe der Zweifarbenfluoreszenztechnik im SNOM Ligand und pathogenes Molekül an der Matrix darzustellen. Von großem Interesse ist dabei die Frage, ob das pathogene Molekül nur am Ligand bindet oder ob es auch zu unspezifischen Wechselwirkungen mit der Matrix kommt. Darüber hinaus soll geklärt werden, bis zu welchem Prozentsatz die inneren Oberflächen der Beads unter den gewählten Beschichtungsbedingungen vom Liganden erreicht werden können. Mit modifizierten Blutversuchen, bei denen Blut durch eine Fluorophor-Lösung ersetzt wird, soll un-

tersucht werden, bis zur welcher Tiefe das pathogene Molekül unter den Bedingungen der Apherese in das Bead eindringen kann.

Nachdem im Vorangegangenen hauptsächlich über die eigene Forschung im Zusammenhang mit Rastersondentechniken berichtet wurde, sollten an dieser Stelle zumindest noch die allgemeinen Hauptstoßrichtungen der Nanobiotechnologie Erwähnung finden: Neben den gezeigten Anwendungen in der Molekularmedizin, im Speziellen in der Diagnostik, in der Oberflächenanalytik medizinisch relevanter Systeme und in der Bioelektronik, müssen Bereiche wie die Entwicklung von biomimetischen Oberflächen (Beschichtungen), von biologischen und biochemischen Sensoren, das Tissue Engineering, die Nanobiopharmazie, die Medizintechnik, die Bioinformatik, die bioinspirierte Informationstechnologie und nicht zuletzt

die Biochiptechnologie als vorrangige Stoßrichtungen genannt werden.

## Literatur

- [1] H. Cohen, M.L. Lightbody: Atomic Force Microscopy/Scanning Tunneling Microscopy, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York (1998)
- [2] O. Marti, M. Amrein: STM and SFM in Biology, Academic Press, San Diego (1993)
- [3] V.J. Morris, A.P. Gunning, A.R. Kirby: Atomic Force Microscopy for Biologists, World Scientific Publishing Company (1999)
- [4] H. Gao, M. Oberringer, A. Englisch, R.G. Hanselmann, U. Hartmann. Ultramicroscopy 86: 145-150 (2001)
- [5] M. Oberringer, U. Hartmann. Bioforum 4: 206-208 (2002)
- [6] A. Englisch, H. Gao, M. Oberringer, R. Hanselmann, U. Hartmann. Biona-Report 14, 77-80 (2000)
- [7] J. Hu, Y. Zhang, H. Gao, M. Li, U. Hartmann. Nano Lett. 2: 55-57 (2002)
- [8] T. Bosch. Artificial Organs 17 (2): 640-652 (1993)
- [9] T. Bosch et al. Artificial Organs 24 (2): 81-90 (2000)
- [10] L.J. Draeger et al. European Journal of Clinical Investigation 28: 994-1002 (1998)
- [11] D.T. Felson et al. Arthritis and Rheumatism Vol. 42, No 10: 2153-2159 (1999)
- [12] E.H. Sasso, C. Merrill, T.E. Furst TE. Therapeutical Apherese (2001)
- [13] M. Zimmermann et al. Clinical Chemistry And Laboratory Medicine 37: 373-379 (1999)
- [14] O. Baroua et al. Journal of Histochemistry and Cytochemistry Vol. 45: 1189-1196 (1997)
- [15] S.J. DeArmond et al. Journal of Neuroimmunology Mar; 1 (1): 3-15 (1981)